

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Recherche des polymorphismes génétiques de deux hyaluronidases

Brichard, Gontran

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**RECHERCHE DES POLYMORPHISMES GENETIQUES
DE DEUX HYALURONIDASES**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Gontran Brichard

Juin 2004

Recherche des polymorphismes génétiques de deux hyaluronidases

BRICHARD Gontran

Résumé

Les hyaluronidases sont une famille d'enzymes intervenant dans la dégradation de l'hyaluronan, un polysaccharide de haut poids moléculaire présent dans la matrice extracellulaire et dans certaines cellules. L'objectif de ce travail est de rechercher des polymorphismes génétiques au niveau de deux hyaluronidases, à savoir l'hyaluronidase 1 (*hyal-1*) et l'hyaluronidase 2 (*hyal-2*), afin d'approfondir les connaissances à propos de ces gènes. Pour réaliser cette recherche, nous avons utilisé une technique de chromatographie liquide à haute performance en conditions dénaturantes (DHPLC) au départ d'ADN extrait du sang de personnes saines et d'ADN extrait de cancers du poumon.

Quatre polymorphismes ont pu être découverts au cours de ce travail, un polymorphisme au niveau d'*hyal-1* et trois polymorphismes au niveau d'*hyal-2*, dont l'un est fréquent (42% de la population saine). Nous avons ensuite tenté de savoir si le fait d'être porteur du polymorphisme au niveau d'*hyal-1* avait une influence sur l'activité hyaluronidasique du plasma. Hyal-1 est considéré à l'heure actuelle comme la seule enzyme qui explique cette activité. Les expériences menées dans cette perspective n'ont toutefois pas permis de montrer une différence d'activité enzymatique par rapport à des patients non porteurs de ce polymorphisme.

La dernière partie du travail a consisté à rechercher des mutations d'*hyal-2* par DHPLC en utilisant de l'ADN issu de carcinomes pulmonaires. En effet, certaines hyaluronidases sont soupçonnées d'être impliquées dans le développement de plusieurs types de cancers et *hyal-2* a été présentée comme un suppresseur tumoral potentiel. Au terme de ce travail, aucune mutation n'a cependant pu être mise en évidence au niveau d'*hyal-2* au départ de l'ADN des 15 carcinomes étudiés.

Au terme de ce mémoire, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont permis d'arriver au bout de ce travail de par leur soutien ou leur aide.

Mes premiers remerciements iront à mes parents et Marie qui ont toujours été présents dans les moments difficiles et qui m'ont permis de mener à bien mes études universitaires.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du laboratoire de biologie moléculaire de l'institut de pathologie et de génétique de Loverval où j'y ai effectué la plus grande partie de mon mémoire. En particulier, je voudrais remercier Pascale Hilbert pour son accueil et son aide précieuse quant à la réalisation de ce mémoire ; Fred, Mélanie, Sébastien, Nathalie et Arnaud pour leurs précieuses explications techniques et pour leur sympathie. Fabien, qui par ses blagues journalières, contribuait à la perpétuelle bonne ambiance du laboratoire. Françoise pour sa gentillesse et pour son aide apportée à l'encodage de ma base de données de patients. Enfin, Xavier, Léonie, Valérie et Cécile qui ont été, comme tous les autres, de sympathiques collègues pendant mon séjour à l'IPG.

Je remercie également Mr Flamion pour son appui, non seulement au cours de ce mémoire, mais également durant ces deux années de licence.

Merci également à madame Mertens et à Sophie pour l'aide apportée dans la partie du mémoire réalisée au sein du laboratoire de physiologie et pharmacologie des FUNDP.

Pour terminer, je tiens à remercier Mme Raes, Mr Bister et Benjamin Damien pour avoir accepté de lire ce mémoire. Merci également à Mr Hérin qui, en plus d'avoir lu ce mémoire, m'a aidé dans la réalisation de ce travail en fournissant le matériel histologique pour l'étude des tumeurs.

Table des Abréviations

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ddATP	Dideoxy Adenosine triphosphate
ddCTP	Dideoxy Cytosine triphosphate
ddGTP	Dideoxy Guanine triphosphate
ddp	Différence de potentiel
ddTTP	Dideoxy Thymine triphosphate
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate
ENTV	Enzootic Nasal Tumor Virus
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
GFP	Green Fluorescent Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
HA	Hyaluronic Acid, Hyaluronan
HABP	Hyaluronic Acid Binding Protein
HAS	Hyaluronan Synthase
Hyal	Hyaluronidase
IPG	Institut de Pathologie et de Génétique
JSRV	Jaagsiekte Sheep Retrovirus
kb	Kilo base
kDa	Kilo Dalton
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PCR	Polymerase Chain Reaction
rpm	Round per minute (tour par minute)
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SPTP	Sérum Physiologique Tamponné au Phosphate
TBE	Tris Borate EDTA
TEAA	Triethylammonium acetate
UTR	Untranslated
UV	Ultraviolet
VNTR	Variable Number of Tandem Repeat

TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION.....	4
A. L'hyaluronan	4
1. Structure	4
2. Localisation	4
3. Synthèse et dégradation.....	5
4. Fonctions	5
5. Régulation de la biosynthèse de l'hyaluronan.....	5
B. Les hyaluronidases	6
1. Généralités sur la famille des hyaluronidases	6
2. Aperçu des différentes hyaluronidases mammaliennes	8
a) PH20.....	8
b) Hyal-3.....	9
c) Hyal-4.....	9
d) HyalP1	9
3. L'hyaluronidase 1.....	10
a) Structure du gène et de la protéine	10
b) Localisation	10
c) Expression	10
d) Activité.....	11
e) La mucopolysaccharidose IX.....	11
4. Hyaluronidase 2.....	11
a) Structure du gène et de la protéine	11
b) Expression	12
c) Localisation	12
d) Activité.....	13
C. Hyaluronidases et cancers	13
D. Les polymorphismes	15
1. Types de polymorphismes.....	15
2. Intérêts actuels et futurs des polymorphismes.....	16
a) SNP et cartographie des gènes	16
b) SNP et diagnostic de maladies	17
c) SNP et prédiction de la réponse aux xénobiotiques	17
E. La recherche de mutations par DHPLC	18
1. Principe.....	18
2. Création des méthodes d'analyse	20

II. BUTS DU MEMOIRE	21
III. MATERIEL ET METHODES	22
A. Recherche des séquences d' <i>hyal-1</i> et <i>hyal-2</i> humains	22
B. Recherche de primers pour l'amplification d' <i>hyal-1</i> et <i>hyal-2</i>	22
C. Matériel biologique employé	22
D. Préparation de l'ADN à analyser	24
1. Extraction d'ADN à partir de sang.....	24
2. Extraction d'ADN à partir de tissus enrobés dans la paraffine	25
3. Dosage de l'ADN extrait.....	25
E. PCR et PCR touchdown	26
F. Contrôle des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose	27
G. Recherche de polymorphismes par DHPLC	28
H. Séquençage nucléotidique automatisé.....	29
I. Zymographie	30
J. Dosage de l'hyaluronan dans le sérum.....	32
IV. RESULTATS	33
A. Choix des primers utilisés en PCR.....	33
1. Primers utilisés pour l'ADN extrait à partir du sang.....	33
2. Primers utilisés pour l'ADN extrait à partir de tissus fixés.....	34
3. Séquençage des fragments amplifiés par chaque couple de primers	35
B. Justification du choix de la polymérase	35
C. Recherche de polymorphismes génétiques dans la séquence codante d' <i>hyal-1</i> et d' <i>hyal-2</i>	37
1. Recherche de polymorphismes au niveau d' <i>hyal-1</i>	37
2. Recherche de polymorphismes au niveau d' <i>hyal-2</i>	40
D. Séquençage des polymorphes découverts et comparaison des séquences avec la forme sauvage correspondante.....	43
1. Polymorphisme au niveau du fragment C de l'exon 1b d' <i>hyal-1</i>	43
2. Polymorphisme au niveau du fragment F de l'exon 2 d' <i>hyal-2</i>	43
3. Polymorphisme au niveau du fragment I de l'exon 3 d' <i>hyal-2</i>	44
4. Polymorphisme au niveau du fragment J de l'exon 4 d' <i>hyal-2</i>	45
5. Position des acides aminés modifiés par les polymorphismes.....	45
6. Résumé des polymorphismes identifiés au niveau des gènes <i>hyal-1</i> et <i>hyal-2</i>	47
E. Comparaison des polymorphismes identifiés avec ceux de la base de SNP du NCBI	48
F. Evaluation de l'activité enzymatique d' <i>hyal-1</i> dans le sérum.....	48
G. Dosage de l'hyaluronan dans le sérum.....	50

H. Recherche de mutations au niveau d' <i>hyal-2</i> dans des carcinomes pulmonaires.....	51
V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES	54
A. Choix de la DHPLC comme méthode de détection de polymorphismes.....	54
B. Inconvénients liés au matériel biologique employé	55
C. Perspectives.....	55
VI. REFERENCES.....	56

I. INTRODUCTION

A. L'hyaluronan

1. Structure

L'hyaluronan ou acide hyaluronique (HA) est un membre de la famille des glycosaminoglycans (Laurent, 1998). Ce polysaccharide anionique est formé d'un motif répété de deux sucres (**Figure I-1**), le N-acétyl-D-glucosamine et l'acide D-glucuronique, liés tous deux de manière alternative par des liens glycosidiques $\beta(1-4)$ et $\beta(1-3)$. Le nombre d'unités disaccharidiques dans une molécule complète d'hyaluronan peut atteindre 10000 unités et plus, ce qui amène le poids d'une telle molécule à plus de 4 millions de Daltons.

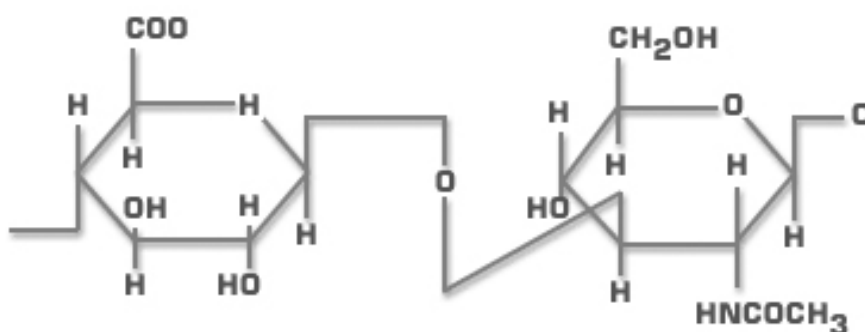


Figure I-1: Structure du disaccharide composé de N-acétyl-D-glucosamine et d'acide D-glucuronique.

2. Localisation

L'hyaluronan est présent chez tous les vertébrés ainsi que dans la capsule de certaines souches de streptocoques. C'est un constituant majeur des matrices extracellulaires et un élément essentiel de tissus comme le cordon ombilical, l'humeur vitrée, le fluide synovial et les tissus à réparation et prolifération rapides. La quantité la plus importante d'hyaluronan se trouve au niveau de la peau, à la fois dans le derme et l'épiderme.

L'hyaluronan se présente sous différentes formes dans l'organisme. Il peut être libre dans la circulation, lié à des protéines de la matrice extracellulaire ou encore associé à des cellules via un certain nombre de récepteurs cellulaires. Actuellement, il est même reconnu que l'hyaluronan peut se trouver au niveau intracellulaire, et ce aussi bien dans le noyau et le nucléole que dans le cytoplasme (Evanko & Wight, 2001).

3. Synthèse et dégradation

La synthèse de l'hyaluronan s'effectue au moyen de trois enzymes connues sous le nom de hyaluronan synthases (HAS1, HAS2, HAS3). Celles-ci catalysent la même réaction de polymérisation, à savoir l'addition alternative d'acide D-glucuronique et de N-acétyl-glucosamine. Au fur et à mesure de la réaction, effectuée au niveau de la membrane plasmique, la chaîne en formation est sécrétée dans l'espace extracellulaire. La dégradation, effectuée par les hyaluronidases, sera examinée en détail plus loin dans ce texte.

4. Fonctions

Il est reconnu depuis plusieurs dizaines d'années que la fonction majeure de l'hyaluronan réside dans le maintien des propriétés biophysiques et homéostatiques des tissus (Laurent, 1998). Cependant, les recherches menées sur cette molécule en apparence simple révèlent une implication dans divers processus complexes tels que la morphogenèse (Toole, 2001), la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire. Le bon déroulement de l'ovulation et des processus de fertilisation dépend lui aussi de l'organisation de l'hyaluronan au niveau des matrices extracellulaires. (Salustri & Fulop, 1999). Les produits de dégradation de l'hyaluronan ont également des fonctions biologiques variables selon leurs poids moléculaires. Ainsi, des fragments supérieurs à 10^5 kDa sont antiangiogéniques, tandis que les fragments de taille intermédiaire sont eux angiogéniques, proinflammatoires et immunostimulants (Stern, 2003). Les tétrasaccharides, produits terminaux du clivage de l'hyaluronan, sont antiapoptotiques et inducteurs potentiels de Heat Shock Proteins (HSP). Les propriétés particulièrement intéressantes de ces différents polysaccharides font l'objet de recherches approfondies quant aux rôles éventuels de l'hyaluronan dans les processus de cancérisation (Heldin, 2003).

5. Régulation de la biosynthèse de l'hyaluronan

La synthèse de l'hyaluronan est sous le contrôle de différents facteurs de croissance. Le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), le TGF- β 1 (Transforming Growth Factor β 1), l'EGF (Epithelial Growth Factor) ainsi que l'IL-1 α (Interleukine 1 α) et l'IL-1 β (Interleukine 1 β) ont été reconnus pour leur rôle dans la synthèse de l'hyaluronan in vitro (Heldin et al., 1989).

B. Les hyaluronidases

1. Généralités sur la famille des hyaluronidases

L'activité hyaluronidasique a été rapportée pour la première fois en 1929 dans les testicules de mammifères par Duran-Reynals en tant que « spreading factor » ou agent de diffusion (Duran-Reynals, 1928). En effet, cet agent permet la propagation de virus et toxines par voie sous-cutanée. Le terme hyaluronidase fut, lui, établi pour la première fois par Karl Meyer dans les années 1940 au vu de la fonction de dégradation de l'hyaluronan de ces enzymes (Meyer, 1947).

Aujourd'hui, grâce au séquençage du génome et aux outils de bioinformatique, on a pu déterminer les membres de la famille des hyaluronidases (**Tableau I-1**). Actuellement au nombre de 6, ces gènes sont groupés en fonction de leurs localisations chromosomiques. Deux groupes de 3 ont ainsi été établis. Le premier, situé sur le chromosome 3, plus précisément dans la région 3p21.3, comprend *hyal-1*, *hyal-2* et *hyal-3*. Le deuxième groupe, lui, est situé sur le chromosome 7 au niveau de la région 7q31.3 et comprend *hyal-4*, *SPAM1* (aussi appelé *PH20*) ainsi qu'un pseudogène nommé *hyalP1*.

Tableau I-1: Les six hyaluronidases identifiées chez l'homme.

Position sur le chromosome	Nom du gène	Nom de la protéine	Produit généré lors de la dégradation de l'HA	Expression	Optimum de pH
3p21.3	<i>Hyal1</i>	Hyal1	Tétra/hexa saccharides	Ubiquitaire	3-4
	<i>Hyal2</i>	Hyal2	20 kDa	Ubiquitaire excepté cerveau adulte	4
	<i>Hyal3</i>	Hyal3	Non connu	Ubiquitaire	Non connu
7p31.3	<i>Hyal4</i>	Hyal4	Non connu	Non connu	Non connu
	<i>SPAM1</i>	PH20	Tétra/hexa saccharides	Testicules	4.5 et 7.5
	<i>HyalP1</i>	aucun	-	-	-

Phylogenetic tree showing the relationships between human and mouse hyaluronan synthase genes. The tree is rooted on the left and branches to the right. The top branch leads to a clade containing Human HYAL4 and Human HYALP1. The next branch leads to a clade containing Human PH-20 and Mouse PH-20. The bottom branch leads to a large clade containing Human HYAL1, Mouse Hyal1, Human HYAL3, Mouse Hyal3, Human HYAL2, and Mouse Hyal2. Within this large clade, Human HYAL1 and Mouse Hyal1 are sister taxa, Human HYAL3 and Mouse Hyal3 are sister taxa, and Human HYAL2 and Mouse Hyal2 are sister taxa. The branches for Human and Mouse genes are color-coded: red for Human and blue for Mouse.

En ce qui concerne la fonction principale des hyaluronidases, à savoir la dégradation de l'hyaluronan, la situation n'est pas tout à fait précise. Il semblerait que deux hyaluronidases, hyal-1 et hyal-2, agissent de concert avec d'autres enzymes pour cataboliser l'hyaluronan. Ce modèle (**Figure I-3**), proposé récemment par Stern (2003), suggère que l'hyaluronan est retenu au niveau de la surface cellulaire grâce à l'effet combiné des récepteurs à l'hyaluronan et d'hyal-2. L'hyaluronan serait ensuite clivé en fragments de taille intermédiaire d'environ 20 kDa par hyal-2. Ces fragments sont délivrés à des structures de type endosomal et finalement lysosomal où le reste du catabolisme a lieu. La dernière étape est réalisée par hyal-1 associée à deux beta-exoglycosidases : une β -glucuronidase et une β -N-acétyl-glucosaminidase.

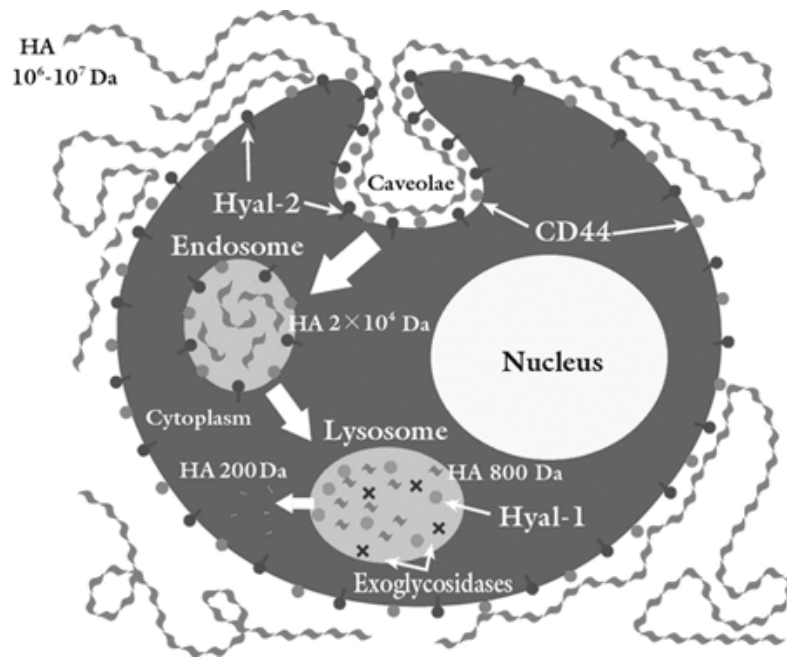


Figure I-3: modèle de dégradation de l'hyaluronan proposé par Stern (Stern 2003).

2. Aperçu des différentes hyaluronidases mammaliennes

En raison de l'attention particulière portée à hyal-1 et hyal-2 dans ce mémoire, celles-ci seront traitées à part.

a) PH20

Des quatre hyaluronidases qui vont être abordées ici, PH20, aussi connue sous le nom de SPAM1, est certainement celle qui est la mieux connue. Elle est impliquée dans le processus d'adhésion entre ovocytes et spermatozoïdes (Cherr et al., 2001). En effet, ces derniers doivent pénétrer une couche de cellules du cumulus entourant l'ovocyte avant d'atteindre la zone pellucide.

Ces cellules sont enchâssées dans une matrice contenant de l'hyaluronan formé avant l'ovulation. PH20 aide donc le spermatozoïde à pénétrer la couche de cellules du cumulus en dégradant l'hyaluronan. PH20 est présent sous deux formes dans les spermatozoïdes, une forme située au niveau de la tête où elle est liée à la membrane via une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI) et une forme soluble située au niveau de la vésicule acrosomale (Cherr et al., 2001).

b) Hyal-3

Actuellement, peu de choses sont connues sur la troisième hyaluronidase de la région 3p21.3. Celle-ci est exprimée dans de nombreux organes, en particulier la moelle et les testicules (Patel et al., 2002). Ces deux tissus se caractérisent par une conservation de cellules souches tout au long de la vie suggérant ainsi un rôle d'hyal-3 dans la régulation des cellules souches (Csoka et al., 2001). Toutefois, on ne connaît pas encore sa fonction exacte *in vivo* et il n'a pas encore été montré d'activité hyaluronidasique *in vitro*.

c) Hyal-4

Hyal-4 est exprimée uniquement au niveau du placenta et du muscle squelettique. On pense qu'elle serait en fait une chondroïtinase dépourvue d'activité hyaluronidasique, ce qui ferait donc d'elle la première chondroïtinase identifiée chez les vertébrés (Csoka et al., 2001). Cette hypothèse est plausible puisque d'une part, la chondroïtine sulfate est proche en structure de l'hyaluronan et d'autre part, hyal-1 et PH20 sont toutes deux capables de cliver la chondroïtine sulfate.

d) HyalP1

HyalP1, le dernier des gènes décrit dans ce chapitre, est en fait un pseudogène chez l'homme car 2 délétions entraînent l'apparition prématurée de codons de terminaison (Csoka et al., 1999). Contrairement à l'homme, *hyalP1* de souris ne contient pas de mutations et pourrait donc encore être une enzyme active chez ces rongeurs ainsi que chez d'autres mammifères (Csoka et al., 2001).

3. L'hyaluronidase 1

a) Structure du gène et de la protéine

Le gène *hyal-1* humain a une taille d'environ 3.5 kb et contient 3 exons (**Figure I-4**). Il code pour un ARNm de 2.6 kb dont la traduction donnera une protéine de 435 aa. A côté de cette forme sauvage, 5 variants ont été définis sur la base d'ARNm trouvés dans des cellules cancéreuses de vessie et de prostate (Lokeshwar et al., 2002). Ces 5 variants encodent respectivement des protéines de 405, 253, 209, 176 et 96 aa. Plusieurs expériences ont été menées afin de quantifier le niveau d'activité de ces variants. Les résultats révèlent que les variants 3, 4 et 5 n'ont pas d'activité. Une activité a pu être mesurée pour la forme sauvage mais le variant 1 qui n'a que 30 aa de moins que la forme sauvage ne montre pas d'activité. Le variant 2 de son côté présente une activité réduite de 90% par rapport à la forme sauvage. Au vu de ces résultats, Lokeshwar et al. (2002) ont conclu que la séquence de 30 aa comprise entre les aa 300 et 331 doit être cruciale pour l'activité de la protéine.

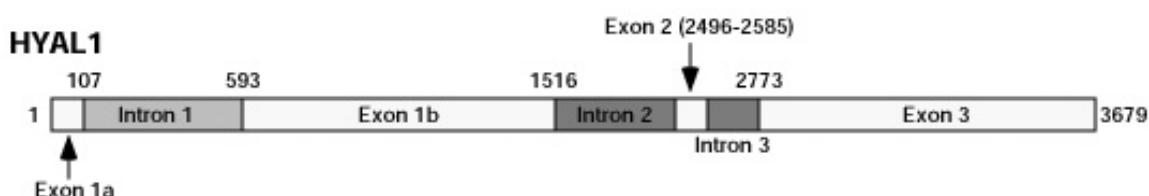


Figure I-4 : structure du gène *hyal-1* (d'après Stern, 2001).

b) Localisation

On trouve *hyal-1* dans le plasma et dans l'urine mais aussi en surface des cellules. Ses caractéristiques biochimiques, notamment son pH optimum acide, et l'existence d'une maladie congénitale de surcharge liée à un déficit en *hyal-1* (cf. ci-dessous) renforcent l'idée d'une localisation lysosomale pour cette enzyme. Ceci reste cependant à démontrer formellement.

c) Expression

L'ARNm d'*hyal-1* est présent dans la plupart des organes avec des taux plus élevés dans le cœur, le foie, les reins, la rate, l'intestin grêle, l'estomac et les poumons (Patel et al., 2002).

d) Activité

L'urine est l'endroit où l'activité d'hyal-1 est la plus élevée : elle y est cent fois supérieure à celle du plasma. Une activité hyaluronidasique associée à une protéine de plus petite taille a également été décelée au niveau de l'urine. Cette activité serait due à un variant d'hyal-1 délété d'environ 100 aa du côté de l'extrémité carboxy-terminale (Csoka et al., 2001).

e) La mucopolysaccharidose IX

Récemment, un patient présentant des accumulations périarticulaires de masses molles, des lésions osseuses, une petite taille et des preuves histologiques de surcharge lysosomale a été examiné en détail ; après analyse de deux gènes supposés être impliqués dans cette pathologie, à savoir *hyal-1* et *hyal-2*, il s'est avéré qu'*hyal-1* présentait deux mutations chez ce patient (Triggs-Raine et al., 1999). L'une était une simple substitution d'acide aminé et l'autre, un réarrangement intragénique complexe conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré. La maladie a été nommée mucopolysaccharidose IX. On pense que le phénotype modéré du patient touché par cette maladie est dû en partie au fait qu'il existe d'autres hyaluronidases et que celles-ci pourraient combler partiellement le déficit engendré par l'*hyal-1* mutée.

4. Hyaluronidase 2

a) Structure du gène et de la protéine

Comme *hyal-1*, le gène *hyal-2* est situé dans la région chromosomique 3p21.3. Sa séquence génomique comprend environ 3600 paires de base et est composée de quatre exons (**Figure I-5**). La protéine hyal-2 possède 473 aa. L'analyse de ces derniers par analogie avec l'hyaluronidase du venin d'abeille indique que les cystéines présentes en position 1-4 et 2-3 forment des ponts disulfures au sein de la protéine (Lepperdinger et al., 2001). Il existe également une région comprenant 6 cystéines au niveau de la partie carboxy-terminale de la protéine.

Cependant, rien n'est actuellement connu quant à la localisation des ponts disulfures dans cette partie de l'enzyme (Lepperdinger et al., 2001). En ce qui concerne l'ARNm, deux variants ont été observés à l'heure actuelle. Ces 2 transcrits ont une taille de respectivement 1848 pb (GenBank Acc. No : NM_003773) et 1918 pb (GenBank Acc. No : NM_033158). Le variant 1 diffère par un premier exon alternatif dans la région 5'UTR bien que celui-ci code pour la même protéine que le variant 2 (Gatphayak, 2003).

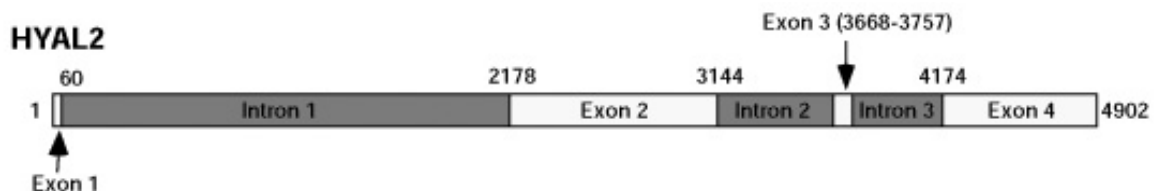


Figure I-5 : Structure du gène *hyal-2* (d'après Stern, 2001).

b) Expression

L'analyse par Northern blot et par Western Blot montre que l'ARNm et la protéine *hyal-2* sont présents dans de nombreux tissus chez l'homme et la souris. Certains organes comme la rate fœtale et adulte, le foie, le cœur et les poumons présentent toutefois des taux d'ARNm plus élevés (Patel et al., 2002). Le cerveau adulte fait exception à cette large distribution puisque l'enzyme y est absente. Une étude plus approfondie a cependant permis de montrer qu'*hyal-2* est exprimée dans le cerveau d'embryons de souris (Lepperdinger et al., 2001). Par la suite, 1 à 2 semaines après la naissance, l'expression de l'enzyme sera réduite via une méthylation des îlots CpG présents dans le promoteur et dans la région 5' non traduite. Ces données laissent supposer une intervention d'*hyal-2* dans le développement cérébral.

c) Localisation

Les études initiales menées sur *hyal-2* laissaient supposer une localisation lysosomale vu son pH optimal très acide (pH 4). Cependant, bien que d'autres expériences utilisant une protéine de fusion *Hyal2*-GFP aient confirmé cette localisation (Lepperdinger et al. 1998), il a été également montré qu'*hyal-2* est localisée au niveau de la membrane plasmique (Rai et al., 2001). De plus, *hyal-2* servirait de récepteur membranaire pour un virus ovin oncogène appelé Jaagsiekte Sheep Retrovirus (JSRV). L'analyse bioinformatique de la séquence d'*hyal-2* prédit l'existence d'une ancre GPI, tout comme son homologue PH20, ce qui renforce l'idée d'une localisation partielle d'*hyal-2* en membrane.

d) Activité

L'activité enzymatique d'hyal-2 est considérablement plus faible que celle des autres hyaluronidases et présente une particularité intéressante. En effet, le produit de la réaction de dégradation de l'hyaluronan est un polysaccharide d'environ 20 kDa, correspondant à 50-60 unités disaccharidiques, alors que les autres hyaluronidases actives peuvent dégrader l'hyaluronan en unités tétra ou hexasaccharidiques (Lepperdinger et al., 2001).

C. Hyaluronidases et cancers

On sait que l'hyaluronan est impliqué dans de nombreux processus cellulaires comme la migration, la prolifération et la différenciation des cellules, et que certains fragments d'hyaluronan stimulent l'angiogenèse (Liu et al., 1996). Par ses propriétés physico-chimiques, l'hyaluronan induit également une hydratation importante des tissus dans lesquels il est présent, ce qui crée des espaces où les cellules peuvent migrer facilement. Au vu de ces propriétés, il n'est pas surprenant que les tumeurs puissent tirer avantage des environnements riches en hyaluronan pour envahir les tissus avoisinants. A ce titre, l'étude des HAS et des hyaluronidases, respectivement impliquées dans la biosynthèse et la dégradation de l'hyaluronan, semble particulièrement importante pour évaluer le rôle exact que joue ce polymère dans la progression tumorale.

Les hyaluronidases pourraient être des supprimeurs de tumeurs. En effet, il a été montré qu'*hyal-1*, *hyal-2* et *hyal-3* sont localisés dans une région d'environ 600 kb sur le chromosome 3 qui est fréquemment délétée dans les cancers (Lerman et Minna, 2000). Cette délétion hémizygote au niveau de la région 3p21.3 s'observe dans de nombreux carcinomes de la tête, du cou, des poumons et de la bouche (Frost et al., 2000). Or, si l'on considère que la présence d'hyaluronan autour des tumeurs est un facteur favorisant leur progression, on comprend aisément « l'avantage » qu'auraient les cellules néoplasiques à perdre l'activité hyaluronidasique. De manière intéressante, l'étude d'*hyal-1* dans ces carcinomes n'a pas montré la présence de mutations au niveau du gène. Cependant, un mécanisme de mise au silence d'*hyal-1* a été récemment proposé (Stern, 2001). Ce mécanisme, basé sur l'épissage alternatif, entraîne la rétention du premier intron d'*hyal-1* dans le transcrit d'ARNm. Cet intron riche en codons start et stop empêcherait la traduction et expliquerait l'absence d'activité hyaluronidasique et de la protéine hyal-1 dans les cellules. Dans d'autres tumeurs, l'expression du gène est perdue via une hyperméthylation des îlots CpG dans la région 5' du promoteur (Csoka et al., 2001).

A ces résultats, où la perte de l'activité hyaluronidasique est corrélée avec une augmentation de la progression tumorale, viennent s'ajouter d'autres études contradictoires. En effet, dans le cas de cancers de la vessie, du sein et de la prostate, il a été rapporté que la tumorigénicité augmente parallèlement à l'activité hyaluronidasique (Lokeshwar et al., 2002). Ces résultats, qui contrastent avec ce qui a été précédemment observé, pourraient s'expliquer par le fait que les hyaluronidases génèrent des fragments d'hyaluronan aux propriétés angiogéniques. Il a d'ailleurs été montré que la surexpression d'hyaluronidases par les cellules tumorales augmentait la division cellulaire (Lin & Stern, 2001) et l'angiogenèse in vivo (Liu et al., 1996).

Un des autres éléments qui compliquent la relation entre hyaluronidase et cancers est la molécule CD44. Cette dernière est une glycoprotéine transmembranaire et joue notamment le rôle de récepteur pour l'hyaluronan (Ponta et al., 2003). CD44 présente plusieurs isoformes produites par épissage alternatif à partir d'un gène unique. La présence de CD44 a été relevée chez de nombreuses cellules, y compris les cellules cancéreuses. L'expression de certains variants de CD44 associée à la présence d'hyaluronan dans le voisinage des tumeurs semble être un facteur important pour la motilité et le pouvoir métastatique des cellules cancéreuses (Stern, 2001). En fait, il apparaît que l'expression de ces variants particuliers du récepteur CD44 requiert la présence continue d'hyaluronan à la surface des cellules car ils présentent une stabilité moindre que le CD44 classique ; l'hyaluronan jouerait ainsi un rôle stabilisateur. Des études *in vitro* ont montré que le traitement de cellules de tumeurs mammaires par l'hyaluronidase réduit non seulement la quantité d'hyaluronan mais aussi l'expression des variants instables du CD44 alors que l'expression du CD44 classique est peu affectée. La même expérience réalisée *in vivo* sur des souris greffées avec un carcinome mammaire humain a confirmé l'importance du traitement à l'hyaluronidase. Après 4 jours de traitement seulement, il a été observé une réduction de 50% de la masse tumorale ainsi qu'une diminution du taux d'hyaluronan autour de la tumeur (Shuster et al., 2002). Ces expériences suggèrent un rôle antitumoral de l'hyaluronidase, du moins exogène.

En 2003, Sugahara et al., ont apporté des informations supplémentaires quant au rôle joué par l'hyaluronan et CD44 dans les tumeurs. Dans ces expériences, des fragments d'hyaluronan d'environ 7 kDa induisaient le clivage du CD44 et la motilité des cellules tumorales alors que les larges polymères d'hyaluronan n'avaient pas cette propriété. Ces derniers résultats vont donc à l'encontre de ce qui a été proposé dans le paragraphe précédent puisqu'ici, une augmentation de l'activité hyaluronidasique serait corrélée avec la progression tumorale.

En ce qui concerne *hyal-2*, ce gène se situe tout comme *hyal-1* dans la région du chromosome 3 délétée dans bon nombre de carcinomes. *Hyal-2* serait donc au même titre qu'*hyal-1* un suppresseur de tumeur potentiel. Cependant, ici aussi, les données disponibles sont contradictoires. En effet, il a été récemment montré que la surexpression d'*hyal-2* dans des cellules provenant d'astrocytomes murins, réimplantées par la suite dans le cerveau de souris, entraînait l'apparition de tumeurs plus invasives et vascularisées que dans le cas d'une réimplantation de cellules ne surexprimant pas *hyal-2* (Novak et al., 1999). La même expérience, menée cette fois au niveau de la peau par injection sous cutanée des cellules, n'a pas montré de différences significatives entre cellules transfectées et non transfectées. Ceci laisse penser que l'invasion tumorale est facilitée par *hyal-2* selon la nature de la matrice extracellulaire.

En plus de son implication dans la cancérogenèse liée à son activité enzymatique, il a été montré qu'*hyal-2* sert de récepteur pour deux virus oncogènes : le JSRV et l'ENTV (Enzootic Nasal Tumor Virus). Le JSRV ne contient pas d'oncogènes connus mais les protéines d'enveloppe de ce virus sont capables de transformer des fibroblastes de rongeurs et des cellules broncho-épithéliales humaines en cellules tumorales (Rai et al., 2001 ; Danilkovitch-Miagkova et al., 2003). Des études récentes montrent qu'un antisérum dirigé contre les protéines de la capsid du JSRV réagit de manière croisée avec des adénocarcinomes humains mais pas avec du tissu pulmonaire sain ou d'autres adénocarcinomes (De Las Heras et al., 2000).

Cette constatation est d'une grande importance car l'analyse morphologique des tumeurs provoquées par ce virus chez le mouton a montré une similarité avec les cancers broncho-alvéolaires chez l'homme. L'hypothèse d'une étiologie virale pour certains types de tumeurs pulmonaires humaines est toutefois loin d'être prouvée.

Le second virus auquel hyal-2 sert de récepteur, appelé ENTV, possède également des protéines de capsid susceptibles d'induire des tumeurs. Les tumeurs liées à ENTV sont localisées au niveau de l'épithélium nasal des moutons.

Que ce soit pour JSRV ou ENTV, le mécanisme à l'origine de la transformation tumorale en présence, mais pas en absence, d'hyal-2 reste incertain. Il semblerait qu'hyal-2 soit associé à RON, un récepteur à activité tyrosine kinase impliqué dans l'activation des Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK) et des Protein Kinases B (PKB, aussi connue sous le nom d'AKT). Lorsque les protéines de capsid de ces virus s'associent à hyal-2, ceci entraînerait la « libération » de RON suivie d'une activation des voies AKT et MAPK menant à la transformation cellulaire (Danilkovitch-Miagkova et al., 2003). Cette hypothèse reste à confirmer.

D. Les polymorphismes

1. Types de polymorphismes

Globalement, on peut diviser les polymorphismes en deux catégories. Une première catégorie composée des Single Nucleotide Polymorphisms (SNP) et une deuxième catégorie comprenant les variations d'ADN engendrées par diverses répétitions de motifs nucléotidiques. On parlera alors de microsatellites ou de minisatellites, encore appelés Variable Number of Tandem Repeat (VNTR), en fonction du type de motif nucléotidique répété.

Les SNP constituent le type le plus simple de polymorphisme génétique et résultent de la substitution d'une seule base par une autre. La fréquence des SNP dans le génome n'est pas encore connue avec certitude. Cependant, selon certaines études, il semblerait que les SNP surviennent en moyenne toutes les 300 à 1000 bases. Les conséquences de telles variations génétiques sont diverses. Si la substitution entraîne l'apparition d'un codon différent sans toutefois faire varier l'aa, on parlera de mutation silencieuse. Au contraire, s'il y a variation au niveau de l'aa codé, on parlera de « missense mutation ». Les conséquences de ces dernières sur le fonctionnement de la protéine varient en fonction de la position de l'aa et en fonction de l'importance des différences physico-chimiques entre l'aa original et son substitut. Parfois, la mutation peut engendrer l'apparition d'un codon stop prématuré, ce qui donnera lieu à une protéine tronquée. On parlera alors de mutation « non sens ». Au vu de ces différentes possibilités, la présence d'un SNP peut donc engendrer diverses conséquences. Le SNP pourra être un simple variant et n'avoir aucune influence sur le fonctionnement d'une protéine ou bien cette variation aura simplement une influence dans l'apparition d'une maladie multifactorielle. D'autre part, le SNP pourra également engendrer une mutation qui se traduira alors par une maladie génétique.

Certains polymorphismes sont la conséquence d'insertions ou de délétions d'une ou plusieurs bases au niveau de la séquence nucléotidique. Lorsque ce genre d'événement survient dans la séquence codante, plus précisément entre le codon start et le codon stop, il peut y avoir un décalage au niveau du cadre de lecture. Ces mutations auront évidemment de lourdes répercussions sur la séquence de la protéine et seront d'autant plus graves que la mutation apparaît tôt après le site d'initiation.

Les microsatellites consistent en un motif de 2 à 5 bases répétées en tandem un nombre variable de fois. Le motif répété le plus fréquemment dans le génome humain correspond à la séquence CA. Lorsque ces motifs atteignent une taille comprise entre une dizaine et une centaine de nucléotides, on parle alors de minisatellites ou de VNTR. Ces derniers, ainsi que les microsatellites, sont extrêmement utiles pour l'étude génétique des populations. En effet, il est très facile de discerner deux personnes puisque la probabilité que deux individus présentent le même nombre de répétitions au niveau d'un polymorphisme donné est très faible.

2. Intérêts actuels et futurs des polymorphismes

Depuis quelques années maintenant, il y a un réel intérêt de la part des chercheurs et des groupes industriels pour l'identification et le catalogage des SNP (Botstein & Risch, 2003). Cette entreprise de taille est rendue possible grâce aux développements technologiques récents qui offrent aux chercheurs des outils performants et rapides dans la recherche de polymorphismes. Comment interpréter les milliers de polymorphismes qui sont actuellement accumulés, et qui continuent de s'accumuler, dans des bases de données ? Quelques débuts de réponse existent.

a) SNP et cartographie des gènes

La variation naturelle de la séquence d'ADN est à la base de l'évolution des génomes et des différences individuelles de prédisposition aux maladies à composantes génétiques chez l'homme. Le séquençage du génome humain offre aujourd'hui la possibilité d'étudier les variations génétiques dans le génome entier pour élucider celles qui sont impliquées dans ces prédispositions. La technique consiste à corrélérer la transmission des marqueurs génétiques (des polymorphismes) avec les caractères phénotypiques caractéristiques d'une maladie. Par exemple, à partir de l'étude de ces corrélations, on peut souvent délimiter une petite région chromosomique qui contient le(s) gène(s) impliqués dans une maladie, puis, par une exploration systématique de tous les gènes situés dans cette région, on peut identifier les variants génétiques qui sont impliqués dans la prédisposition (Schork et al., 2000).

Pour utiliser ces informations contenues dans le génome, il a donc fallu construire des cartes génétiques en étudiant la position de plusieurs milliers de marqueurs tels que les microsatellites. Cependant, si de telles cartes offrent une résolution suffisante pour localiser le gène responsable d'une maladie monogénique, il n'en va pas de même pour les maladies multifactorielles où plusieurs gènes sont susceptibles de jouer un rôle dans la maladie. L'enjeu, s'il on veut étudier ces maladies multifactorielles, est de développer une cartographie à grande échelle avec une résolution élevée. A ce titre, les SNP représentent des marqueurs idéaux pour obtenir une haute résolution puisque ceux-ci sont relativement fréquents dans le génome.

En pratique, on étudie le déséquilibre de liaison (« linkage disequilibrium »). Ce dernier représente le phénomène par lequel la présence d'un allèle sur un chromosome rend probable la présence d'un autre allèle particulier sur le même chromosome et ce dans une région adjacente. Le déséquilibre de liaison entre un SNP et un locus de maladie permet, dans certains cas, d'établir une association entre marqueur et maladie. Le degré du déséquilibre de liaison, et donc la force de l'association, décroît au cours des générations, en fonction de la distance génétique entre loci, si bien que seuls les SNP qui se trouvent à proximité du locus de la maladie présentent une association plus forte avec le phénotype. En étudiant un nombre suffisant de SNP dans toutes les régions de liaison, on pense que sur la base des études d'association, de nombreux loci de maladies pourront être cartographiés avec précision.

b) SNP et diagnostic de maladies

Lorsqu'un SNP est identifié comme étant associé à un phénotype ou à une maladie particulière, on peut utiliser l'information fournie par ce polymorphisme pour développer des outils de pronostic et de diagnostic (Schork et al., 2000). Un des exemples pratiques que l'on peut citer est celui de l'apolipoprotéine E (ApoE). Ce gène présente deux polymorphismes dont un est associé avec un risque élevé de développer la maladie d'Alzheimer (Cedazo-Minguez & Cowburn, 2001). Bien sûr, la présence de ce SNP n'est pas un indicateur absolu de développement de la maladie. En effet, certaines personnes ne développeront jamais la maladie malgré la présence du polymorphisme. Des facteurs supplémentaires doivent être pris en compte pour évaluer l'apparition de la maladie.

c) SNP et prédiction de la réponse aux xénobiotiques

La réponse à un médicament ou tout autre xénobiotique peut varier d'un individu à l'autre. En effet, face à une substance donnée, il existe une variabilité interindividuelle quant à la vitesse de métabolisation ou la susceptibilité de développer des effets secondaires plus ou moins graves. Ces variations de réponse aux xénobiotiques, s'expliquant en partie par les polymorphismes génétiques, intéressent fortement les recherches d'une discipline en plein essor, la pharmacogénétique. Les initiatives dans ce domaine ont pour but d'identifier les patients dont les réactions vis-à-vis d'une substance sont similaires et qui ont un profil génétique commun. Ensuite, il sera possible de concevoir des traitements adaptés ou à la carte en fonction du profil génétique du patient.

E. La recherche de mutations par DHPLC

1. Principe

La DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) est une méthode chromatographique permettant la détection de substitutions de bases, de petites délétions ou d'insertions au niveau de l'ADN. Grâce à sa rapidité et sa résolution élevées, cette méthode est particulièrement utile pour la recherche de polymorphismes dans l'ADN.

En pratique, l'analyse commence par une PCR classique afin d'amplifier le fragment étudié. Si la région amplifiée présente un polymorphisme hémizygote, deux types de fragments, correspondant à l'allèle sauvage et à l'allèle polymorphe, seront présents dans le produit de PCR. Cette première étape est suivie d'une étape de dénaturation – renaturation afin de créer des hétéro- et homoduplexes à partir des deux populations présentes dans la PCR (**Figure I-6**). Pour rechercher un polymorphisme homozygote, il faut procéder de la même manière en mélangeant au préalable une population d'ADN sauvage à une population d'ADN polymorphe pour obtenir des hétéroduplexes après l'étape de dénaturation – renaturation.

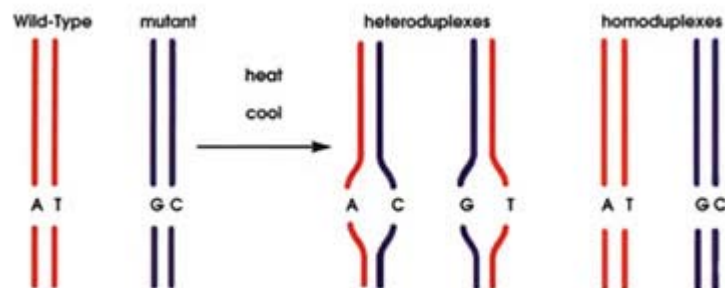


Figure I-6: Création des hétéro- et homoduplexes pour la DHPLC.

Les hétéroduplexes sont en fait des doubles brins d'ADN formés d'un brin venant de l'allèle sauvage et d'un brin issu de l'allèle polymorphe. La formation de tels fragments d'ADN entraîne alors l'apparition d'un "mismatch" ou mauvais appariement à l'endroit où est localisé le polymorphisme.

Ces « mismatches » présents au niveau des hétéroduplexes sont à la base de la détection de polymorphismes par la DHPLC. En effet, les hétéroduplexes, thermiquement moins stables que leurs homoduplexes correspondants, seront résolus grâce à la chromatographie lorsqu'ils seront soumis à une température suffisamment élevée. La conséquence de cette instabilité sera un désappariement des deux brins d'ADN dans la région du polymorphisme lorsque l'ADN sera chauffé à température adéquate. Ce désappariement entraînera dès lors une diminution de l'interaction avec la colonne et donc un temps de rétention réduit par rapport aux homoduplexes lors de la séparation chromatographique.

Pour observer ce phénomène de séparation, la DHPLC utilise une colonne greffée d'une phase stationnaire non poreuse composée de poly(styrène-divinylbenzène) alkylé. Cette phase stationnaire est électriquement neutre et hydrophobe. L'ADN, lui, est chargé négativement au niveau de ses groupements phosphates et ne peut donc s'adsorber de lui-même au niveau de la colonne. Afin de rendre l'adsorption possible, on utilise de l'acétate de triéthylammonium (TEAA). Les ions ammonium chargés positivement de ces molécules interagissent avec l'ADN et les chaînes alkyl, avec la surface hydrophobe de la phase solide.

Ainsi, lorsque les hétéroduplexes sont partiellement dénaturés par chauffage, des charges négatives subissent une délocalisation partielle et la force d'interaction entre l'ADN des hétéroduplexes et la colonne diminue en comparaison à la force d'interaction des homoduplexes. Ces derniers seront alors élués moins rapidement par la phase mobile, composée d'acétonitrile, par rapport aux hétéroduplexes qui passeront alors les premiers devant le détecteur UV (**Figure I-7**).

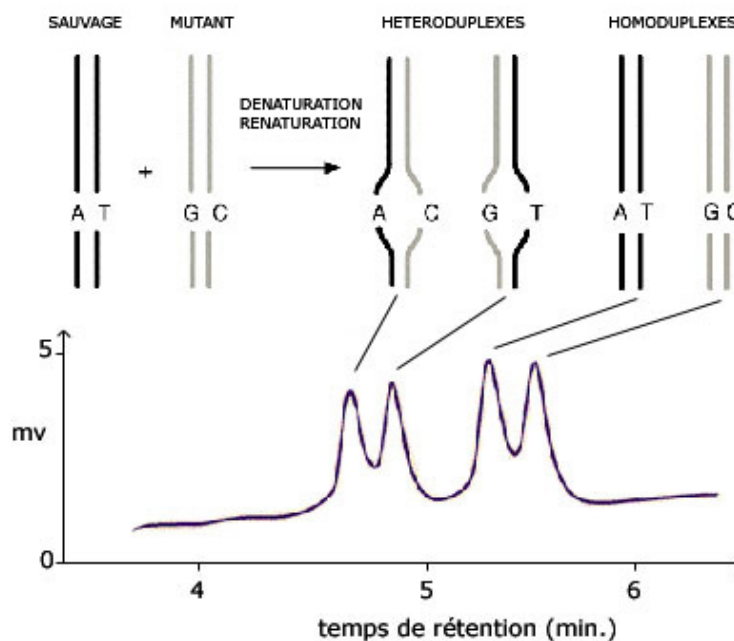


Figure I-7: Exemple de séparation d'hétéro- et homoduplexes par DHPLC.

2. Création des méthodes d'analyse

La température constitue le paramètre essentiel sur lequel il faut se baser pour déterminer les conditions d'analyse d'un fragment d'ADN par DHPLC. C'est la température qui permettra de différencier les homoduplexes des hétéroduplexes en dénaturant partiellement ces derniers. La température devra être établie en fonction de la composition en nucléotides du fragment à analyser. Pour cela, on utilise un programme informatique, le Navigator software®, développé par la firme Transgenomic, qui permet, après introduction de la séquence du fragment d'ADN, de tester *in silico* différentes températures d'analyse. Pour chaque température, le programme prédit dans quelles proportions se fera la dénaturation et ce pour chaque région du fragment d'ADN. Idéalement, on essaie d'obtenir une proportion de fragments dénaturés comprise entre 50 et 75% afin d'être dans des conditions qui optimisent la détection de variants (**Figure I-8**).

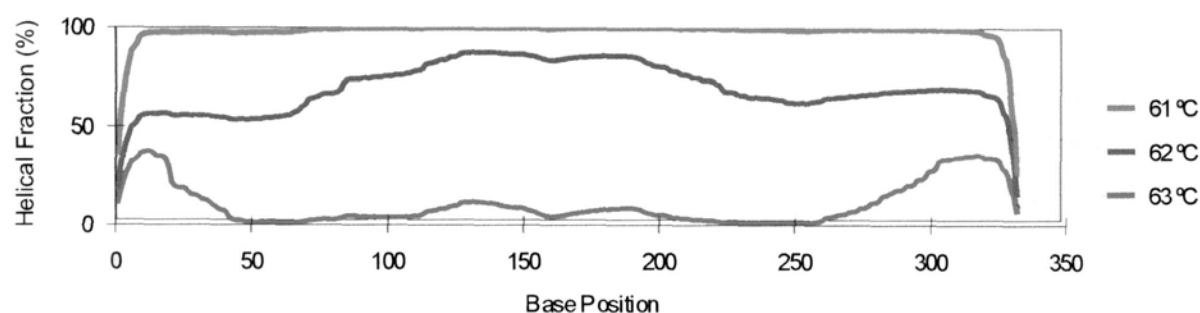


Figure I-8: Profil de dénaturation en fonction de la température et de la position dans le fragment d'ADN.

Le nombre de températures d'analyse sera fonction de l'homogénéité de la composition en nucléotides de l'ADN à analyser. Si le fragment est constitué de manière homogène sur toute sa longueur, une seule température d'analyse peut être suffisante. En pratique, ceci est rarement le cas et l'analyse d'un fragment requiert généralement deux ou trois températures d'analyse. Le dernier point important à prendre en compte sur les températures prédites est que celles-ci prédisent la dénaturation de fragments homozygotes. Or, nous ne voulons obtenir que la dénaturation des hétérozygotes. Pour cela, il suffit de soustraire un degré à chaque température prédite. De cette manière, la température sera insuffisante pour déstabiliser les homoduplexes mais pas les hétéroduplexes dont la stabilité d'appariement est réduite.

Le second paramètre important à prendre en compte est le temps de rétention. Idéalement, celui-ci doit se trouver entre 1.7 et 2.1 minutes, afin d'obtenir une résolution suffisante. Pour ce faire, on utilise un gradient de concentration dans la phase mobile. Ce gradient est défini en fonction des caractéristiques du fragment étudié et pour chacune des températures qui ont été prédites pour l'analyse. Le gradient consiste en un mélange de TEAA et d'acétonitrile dont on fait varier la concentration au cours du temps. L'utilisation d'un gradient spécifique pour chaque condition d'analyse permet ainsi de faire apparaître les pics du chromatogramme dans le domaine analytique désiré.

II. BUTS DU MEMOIRE

Le premier but de mon travail est de rechercher la présence de variations génétiques dans les hyaluronidases 1 et 2 (*hyal-1* et *hyal-2*). Peu de choses sont actuellement connues à propos de cette famille d'enzymes aux fonctions multiples ; en particulier, leurs variations génétiques qui n'ont pas encore été étudiées. Cette recherche de variants sera effectuée au moyen d'une technique de chromatographie liquide à haute performance en conditions dénaturantes (DHPLC). Par la suite, les régions d'ADN soupçonnées d'être porteuses de variations génétiques seront séquencées afin de déterminer avec précision s'il s'agit d'un simple SNP, de délétions ou d'insertions nucléotidiques.

La recherche de polymorphismes pour *hyal-1* et *hyal-2* sera d'abord effectuée sur l'ADN d'une population composée d'une centaine de patients sains. Si des polymorphismes sont détectés au niveau d'*hyal-1*, nous tenterons d'évaluer l'impact que peuvent avoir ces polymorphismes sur le métabolisme de l'hyaluronan. Pour cela nous évaluerons l'activité hyaluronidasique du plasma par zymographie ainsi que la quantité d'hyaluronan dans le sérum par dosage immunoenzymatique chez des patients porteurs ou non de ces variations. Dans l'état actuel des connaissances, *hyal-1* est considérée comme la seule source d'activité hyaluronidasique dans le sérum.

La deuxième partie de mon travail consistera à utiliser la même technique de DHPLC sur de l'ADN issu de tissus de carcinomes pulmonaires enrobés dans la paraffine. Le but de cette démarche est de rechercher des corrélations entre le développement de ce type de tumeurs et la présence d'une ou plusieurs éventuelles mutations au niveau d'*hyal-2*.

III. MATERIEL ET METHODES

A. Recherche des séquences d'*hyal-1* et *hyal-2* humains

Les séquences d'*hyal-1* et *hyal-2* humains proviennent de la base de données du site www.ensembl.org. Ces séquences sont disponibles sous la référence **ENSG00000114378** pour *hyal-1* et **ENSG00000068001** pour *hyal-2*.

B. Recherche de primers pour l'amplification d'*hyal-1* et *hyal-2*

Initialement, des primers trouvés dans la littérature (Triggs-Raine et al., 1999) ont été employés pour produire les différents fragments d'ADN requis dans la recherche de polymorphismes d'*hyal-1* et *hyal-2*. Cependant, certains de ces primers ont dû être abandonnés par manque de spécificité ou pour cause d'amplification insuffisante. Un nouveau choix de primers a donc été réalisé grâce à Primer3, un programme de bioinformatique en ligne, fourni par le site <http://frodo.wi.mit.edu/>.

Deux familles de primers seront employées ici. La première comprend les primers définis pour amplifier les régions codantes ainsi que les jonctions introns – exons d'*hyal-1* et *hyal-2* lorsque l'ADN est extrait à partir de sang frais (**Tableaux III-1 et III-2**). La deuxième famille (**Tableau III-3**) est constituée de primers qui seront utilisés pour amplifier les régions codantes d'*hyal-2* lorsque l'ADN est extrait de tissus tumoraux enrobés dans la paraffine. Dans ce cas, des fragments plus courts doivent être amplifiés car l'ADN extrait de coupes en paraffine est fortement fragmenté et il est dès lors difficile d'obtenir une amplification efficace lorsque les fragments d'ADN générés dépassent une taille d'environ 300 à 350 paires de bases.

C. Matériel biologique employé

La recherche de polymorphismes au niveau des gènes *hyal-1* et *hyal-2* a été effectuée sur de l'ADN extrait à partir du sang d'une centaine de patients sains. Le sang est prélevé en tubes EDTA en vue d'analyses génétiques ; il est envoyé à l'IPG durant la journée du prélèvement. En plus de l'extraction d'ADN, du sérum de chacun de ces patients a été conservé à – 80°C en prévision d'analyses ultérieures.

En ce qui concerne l'étude des carcinomes pulmonaires, l'ADN provient de l'extraction de tissus fixés dans le formol et enrobés dans la paraffine. Ces échantillons ont été fournis par le Dr Michel Hérin à partir de la banque d'échantillons de l'IPG.

Tableau III-1: Primers utilisés pour l'amplification d'*hyal-1*

Code du couple de primers	Séquence du primer sens	Taille du fragment amplifié
	Séquence du primer antisens	
A	5'-GTCTGAGAGGCAACTCGGATGTG-3'	537 pb
	5'-ATCAGGCTGGCATTCTGGGGCAG-3'	
B	5'-GGAGCCTGTGTTTGGTGGTCTGC-3'	428 pb
	5'-GCTGGTCATTTTGGGCACGGCTG-3'	
C	5'-CCCTGACTGCTACAACCTATGACTT-3'	366 pb
	5'-AAAGCTAAAGTACCCCAAGGCTGG-3'	
D	5'-GTCCCATGGCCAGAGCAGCCCCA-3'	326 pb
	5'-ACCTGCTGGTCAGCCAGGACTTT-3'	
E	5'-AAAGTCCTGGCTGACCAGCAGGT-3'	487 pb
	5'-AGGTTCTCAATATGTGCAACTCAG-3'	

Tableau III-2: Primers utilisés pour l'amplification d'*hyal-2*

Code du couple de primers	Séquence du primer sens	Taille du fragment amplifié
	Séquence du primer antisens	
F	5'-ATGGGCTTTGGGAGCATAGATG-3'	419 pb
	5'-CACAGACCTTCCGGCAGAATC-3'	
G	5'-ACCGCGACCGTCTAGGCCTGTAT-3'	387 pb
	5'-AGAGGTAGAAGCCCCAGAGGTGC-3'	
H	5'-CCCTGACTGGCCTCCAGA-3'	497 pb
	5'-TAACCCAAATGTGCAGTGGA-3'	
I	5'-GGTTGAGCTGGGAGTTCAGCAGG-3'	280 pb
	5'-ACCTGAGGTTGGTAGCCAAAGGC-3'	
J	5'-CTGTGGGCTGAGGCAGCTGACC-3'	498 pb
	5'-AGGCCAGCTTGCTAGGCAGCTA-3'	

Tableau III-3: Primers utilisés pour l'amplification d'*hyal-2* lorsque l'ADN est extrait de tissus enrobés dans la paraffine

Code du couple de primers	Séquence du primer sens	Taille du fragment amplifié
	Séquence du primer antisens	
1	5'-GTT CTC CCC AAC CCT TCT TC-3'	250 pb
	5'-CAA AGG CAT TCA GGT CCA GT-3'	
2	5'-CAC CAC CCA TCT TCA CTG G-3'	300 pb
	5'-CAG ACT CCT GTG TCC GAA TG-3'	
3	5'-TGG AGC ACT ACA TTC GGA CA-3'	201 pb
	5'-GTG CTG CGA ACT CAA ACT CA-3'	
4	5'-CCC TGA CTG GCC TCC AGA-3'	250 pb
	5'-CGT GCT CTC AGC CCA CAG-3'	
5	5'-CTG CCC TGA TGT TGA GGT G-3'	308 pb
	5'-TAA CCC AAA TGT GCA GTG GA-3'	
6	5'-AGT TTC CAT CTG GGC CTG T-3'	250 pb
	5'-GGC ACT AGG CGG AAA CTG T-3'	
7	5'-GTC CCC TAC GTG GTC AAT GT-3'	248 pb
	5'-CTC CAG CCC AAG TAG CAC TG-3'	
8	5'-CAT TGA CCA CCT GCA GAC AC-3'	243 pb
	5'-GCA GGG TCC TAC ATG CCT AA-3'	
9	5'-CTA GCA AGC TGG CCT CTA CC-3'	232 pb
	5'-GGG AGT AGG GTC AGG TCC TC-3'	

D. Préparation de l'ADN à analyser

1. Extraction d'ADN à partir de sang

L'extraction d'ADN se passe en deux étapes. Une première étape consiste à lyser les cellules et à digérer les protéines contenues dans le sang. La deuxième étape constitue l'extraction proprement dite.

Protocole d'extraction :

1) Lyse des cellules et digestion des protéines

- a. Ajouter 3 ml de sang sur héparine ou sur EDTA dans un falcon de 15 ml et compléter par de la solution de « lysis 1x ».
- b. Incuber 5 min à température ambiante.
- c. Centrifuger 5 min à 2200 rpm.
- d. Jeter le surnageant et retourner le tube 2 min afin de sécher le culot.
- e. Resuspendre le culot dans 2 ml de solution saline.
- f. Ajouter 200 µl de SDS 10% et 50 µl de protéinase K à 20 mg/ml.
- g. Laisser digérer pendant une nuit à 60°C avec agitation.

2) Extraction

- a. Ajouter 0.8 ml de solution PPS au lysat ramené à température ambiante.
- b. Vortexer 30 sec. jusqu'à obtention d'un mélange uniforme.
- c. Centrifuger 10 min. à 3800 rpm.
- d. Récupérer le surnageant dans un tube.
- e. Ajouter 2 volumes d'éthanol (conservé à -20°C).
- f. Mélanger par inversion jusqu'à l'obtention de la pelote d'ADN.
- g. Rincer à l'éthanol 70% et ajouter ensuite 500 µl de T₁₀E₁.

Solutions

Composition des solutions employées dans l'extraction d'ADN.

Lysis 10x pour 500 ml	Solution Saline pour 500 ml	Solution PPS	T10E1 pour 1 l
<ul style="list-style-type: none">• 45 g de NH₄Cl• 5 g de KHCO₃• 0.185 g EDTA-NA• Porter à 500 ml avec H₂O	<ul style="list-style-type: none">• 12.5 ml NaCl 3M• 24 ml EDTA 0.5M• Porter à 500 ml avec H₂O	<ul style="list-style-type: none">• Porter 500 g de CH₃COONH₄ à 650 ml avec H₂O	<ul style="list-style-type: none">• 10 ml de Tris-HCl 1M• 2 ml d'EDTA 0.5M• Porter à 1 l avec H₂O

2. Extraction d'ADN à partir de tissus enrobés dans la paraffine

L'extraction de l'ADN contenu dans des tissus enrobés dans la paraffine a été réalisée avec le kit TAKARA DexpatTM. L'utilisation de ce kit réduit le temps d'extraction à environ 25 minutes contrairement aux méthodes conventionnelles où l'extraction dure entre 2 et 3 jours.

Protocole d'extraction :

- 1) Préparer des sections de tissus fixés par découpage des blocs de paraffine à l'aide d'un microtome.
- 2) Ajouter 1 à 3 sections par échantillon de paraffine d'au moins 6mm sur 6mm dans un tube eppendorf de 1.5ml.
- 3) Ajouter 0.5 ml de DexpatTM dans chaque tube puis vortexer le tout pour homogénéiser.
- 4) Incuber les tubes à 100°C pendant 10 minutes dans un bloc chauffant.
- 5) Centrifuger les tubes pendant 10 minutes à 12000 rpm et à 4°C.
- 6) Enlever la fine couche de paraffine présente en surface du tube et collecter le surnageant en veillant à ne pas entraîner les débris présents dans le culot.
- 7) Utiliser 4µl de surnageant comme source d'ADN pour une PCR avec un volume total de 50µl.

3. Dosage de l'ADN extrait

Le dosage s'effectue uniquement pour l'ADN extrait à partir du sang. En effet, l'extraction à partir de coupes de paraffines donne, en plus de l'ADN, des impuretés qui faussent la mesure de concentration d'ADN dans la solution.

Ce dosage s'effectue au moyen d'un spectrophotomètre GeneQuant de la firme Pharma Biotech réglé pour émettre une longueur d'onde de 260 nm. La lumière émise à cette longueur d'onde est absorbée spécifiquement par l'ADN qui peut ainsi être quantifié par la loi de Lambert-Beer. On mesure également grâce au spectrophotomètre la pureté de l'échantillon en calculant le rapport entre l'absorption à 260 nm et l'absorption à 280 nm. S'il est compris entre 1.6 et 2, l'extraction d'ADN est considérée comme correcte.

E. PCR et PCR touchdown

La PCR est une technique couramment employée en biologie moléculaire qui permet d'obtenir un grand nombre de copies d'un fragment d'ADN donné. Cette technique, se déroulant totalement *in vitro*, ne nécessite que quelques éléments pour être mise en place. Le matériel de départ de la PCR est une solution d'ADN double brin contenant la séquence nucléotidique que l'on veut amplifier.

A cette solution d'ADN viennent s'ajouter les quatre déoxynucléotides, l'ADN polymérase et son tampon ainsi que les amorces, complémentaires des deux brins d'ADN, qui délimiteront le fragment à amplifier et qui sont requis par la polymérase pour commencer la synthèse d'ADN (**Tableau III-4**).

Dans ce mémoire, deux types de polymérase ont été employées, l'Optimase® de la firme Transgenomic et l'Amplitaq Gold® de chez Applied biosystem, toutes deux employées pour leur grande fidélité dans l'amplification de l'ADN.

Tableau III-4 : Composition des MIX PCR pour les deux polymérases.

Optimase		AmpliTaq Gold	
Mix PCR pour un vol. total de 50 µl		Mix PCR pour un vol. total de 50 µl	
ADN 50 ng/µl	1 µl	ADN 50 ng/µl	4 µl
H ₂ O	41 µl	H ₂ O	23.6 µl
Tp Optimase + MgCl ₂	5 µl	Tp Amplitaq	5 µl
dNTP 10mM chacun	1 µl	MgCl ₂	5 µl
Mix Primers F+R 10 µM chacun	1.5 µl	Primers F	5 µl
Optimase 5 u/µl	0.5 µl	Primers R	5 µl
		dNTP 10mM chacun	2 µl
		Amplitaq gold	0.4 µl

Les PCR ont été réalisées sur appareils BIOMETRA et EPPENDORF à couvercles chauffants permettant d'effectuer la PCR sans utilisation d'huile. La programmation des différents cycles de température a été réalisée selon un protocole de PCR « touchdown » qui permet de réduire l'amplification de fragments parasites (**Tableau III-5**). Classiquement, on choisit une température d'annealing plus élevée de 8 degrés environ. Pendant les 15 premiers cycles de la PCR, la température d'hybridation diminuera de 0.5 degrés lors de chaque cycle. Ceci afin d'atteindre la température « normale » pour les 20 derniers cycles de la PCR. Le choix d'une température d'annealing élevée en début de PCR permet d'augmenter la spécificité du processus d'amplification. En effet, à haute température, seul l'ADN apparié de manière correcte sera stable contrairement aux produits mal appariés. Ainsi, ces premiers cycles de PCR permettront de créer un grand nombre de produits PCR spécifiques qui serviront par la suite de template pour les cycles « classiques » restants.

Tableau III-5: Programmation des cycles de la PCR touchdown.

	Température	Durée	Nombre de cycles
Activation	95°C	5 min.	1x
Désappariement	95°C	30 sec.	15x
Hybridation	(t° hybridation + 8°C) – 0.5°C par cycle	30 sec.	
Élongation	72°C	1 min.	
Désappariement	95°C	30 sec.	
Hybridation	t° hybridation (entre 58 et 62°C selon les primers)	30 sec.	20x
Elongation	72°C	1 min.	
Terminaison de l'élongation	72°C	5 min.	1x

Lorsque la PCR proprement dite est terminée s'ensuit une étape de dénaturation - renaturation qui permet de former des hétéroduplexes lorsqu'un polymorphisme est présent dans la séquence de l'ADN amplifié (**Tableau III-6**).

Tableau III-6: Etapes du processus de dénaturation renaturation.

	Température	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation Renaturation pour Formation d'hétéroduplexes	95°C	3 min.	1x
	95°C – 1.6°C par cycle	30 sec.	30x
	95°C – 1.6°C par cycle	30 sec.	
	15°C	∞	1x

F. Contrôle des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique qui permet la séparation de fragments d'ADN selon leur taille.

En pratique, chaque échantillon est mélangé à du bleu de bromophénol, une substance permettant d'augmenter le poids moléculaire des fragments d'ADN. Ensuite, on dépose les échantillons à analyser dans les puits du gel préalablement immergé dans une cuve contenant du tampon TBE 0.5x. On dépose également dans un ou plusieurs puits un marqueur de poids moléculaire qui permettra d'identifier, par comparaison des fragments d'ADN, la taille de ces derniers.

Lorsque les échantillons et les marqueurs sont déposés, on soumet le gel à un champ électrique en appliquant une ddp aux extrémités de la cuve. L'ADN étant chargé négativement, il va migrer de celui-ci vers l'anode avec une vitesse proportionnelle à sa taille. Après avoir laissé migrer pendant un temps suffisant, on visualise les bandes d'ADN sur le gel grâce à du bromure d'éthidium qui fluoresce lorsqu'il est soumis à un rayonnement ultraviolet.

Cette substance est en fait un agent intercalant qui s'insère au niveau de la double hélice d'ADN et permet ainsi son marquage.

Protocole de l'électrophorèse :

1) Préparation du gel

- a. Ajouter 100 ml de tampon TBE 0.5x à 1.5g d'agarose préalablement pesé dans un erlenmeyer de 250ml.
- b. Porter la solution à ébullition jusqu'à ce que celle-ci devienne parfaitement transparente.
- c. Ajouter 1ul de bromure d'éthidium pour 100ml de solution et homogénéiser
- d. Couler le gel dans le support adéquat
- e. Placer les peignes avec le nombre de dents souhaité sur le support
- f. Laisser refroidir pendant environ 30 minutes afin que le gel polymérise
- g. Déposer le gel sur son support dans la cuve d'électrophorèse de manière à ce que le gel soit entièrement recouvert de tampon

2) Dépôt des échantillons

- a. Prendre 10, 15 ou 20 ml d'échantillon selon la contenance des puits et mélanger avec 1/7 de solution alourdissante.
- b. Déposer un échantillon par puits
- c. Déposer le(s) marqueur(s) de poids moléculaire dans des puits adjacents à ceux des échantillons.

3) Migration

- a. Etablir une ddp (environ 150V) aux extrémités de la cuve pendant un temps adéquat pour la séparation.

G. Recherche de polymorphismes par DHPLC

Le principe de la DHPLC ayant été vu en détail dans l'introduction, seul sera décrit ici le matériel utilisé.

- Appareillage DHPLC : Transgenomic WAVE®
- Colonne de chromatographie : DNASep® Cartridge de la firme Transgenomic.
- Tampons utilisés pour l'injection des échantillons : Tampon A (acétate de triéthylammonium 0.1 M) et Tampon B (acétate de triéthylammonium 0.1 M / 25% acétonitrile)

H. Séquençage nucléotidique automatisé

Le séquençage automatique est basé sur la méthode développée par Sanger. Celle-ci commence par une amplification par PCR du fragment d'ADN à séquencer. Ensuite, on effectue une réaction de séquence, au principe semblable à la PCR, sur le fragment amplifié. L'unique différence avec une PCR classique se situe au niveau des déoxynucléotides. En effet, en plus des déoxynucléotides, on ajoute dans le mélange de PCR des didéoxynucléotides qui ont la particularité de stopper la réaction d'amplification lorsqu'ils sont incorporés à un fragment en cours de synthèse.

Chaque didéoxynucléotide (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) est couplé à un fluorophore différent, ce qui permet de les différencier lorsqu'ils sont soumis à un rayonnement laser. Lorsque l'amplification est terminée, la solution contient ainsi une population de fragments d'ADN de taille variable en raison de l'incorporation aléatoire de didéoxynucléotides.

Ces différents fragments seront ensuite séparés grâce à l'électrophorèse capillaire. Cette technique de séparation utilise un bloc de capillaires (en l'occurrence 16) de diamètre inférieur à 0.1mm. Chaque capillaire contient un gel de séparation et plonge dans un puits contenant l'échantillon à analyser. Les échantillons sont ensuite injectés dans le capillaire qui sera ensuite soumis à un champ électrique permettant la séparation des fragments d'ADN. Lorsque ceux-ci arrivent au niveau des détecteurs, un laser les irradie et il y a alors émission d'un rayonnement dont la longueur d'onde est fonction du fluorochrome présent. Dans le même temps, un logiciel informatique se charge de décoder la séquence de l'échantillon à analyser en fonction de l'ordre de passage des fragments d'ADN devant le détecteur.

Protocole de séquençage :

1) Effectuer la réaction PCR

- a. Faire une PCR classique dans un volume total de 50 µl sans utilisation d'huile. Vérifier ensuite sur gel.

2) Purifier les produits PCR

- a. Etiquetter 2 séries d'éppendorfs (millipore) du kit (avec ergot).
- b. Prendre les 50 µl de produit PCR et transvaser dans la colonne préalablement déposée sur un tube eppendorf (bleu au dessus).
- c. Centrifuger 12 minutes à 500g.
- d. Retourner la colonne (blanc au dessus) sur un nouvel eppendorf.
- e. Centrifuger 3 minutes à 1000g.
- f. Jeter la colonne et réajuster le volume à 50 µl avec de l'eau milliQ.
- g. vérifier sur gel afin de déterminer la quantité de produit PCR.
- h. Conserver à 4°C.

3) Effectuer la réaction de séquence

- a. Pour une réaction, mélanger 2 µl de mix big dye terminator à 3.2 µl de primer dilué à 1µM et à 12.8 µl d'eau.
- b. Ajouter ensuite au mélange 2 µl de produit PCR purifié
- c. Faire la réaction PCR avec la programmation en température suivante :

95 °C 15"

50 °C 10" **X** 30

60 °C 2'30"

Redescendre à 15°C et stocker à 4 °C à l'abri de la lumière

4) Purifier le produit de séquence

- a. Placer une colonne de purification Centrisep, préalablement hydratée, sur un tube collecteur.
- b. Déposer 20 µl du produit de séquence sur le centre de la colonne, centrifuger pendant 2 min à 3000 rpm et jeter la colonne.
- c. Déposer 12 µl d'eau plus 4 µl de produit de séquence purifié dans un puit d'une plaque 96 puits.
- d. Charger la plaque dans le séquenceur et lancer le séquençage.

I. Zymographie

La zymographie est une technique impliquant l'électrophorèse d'enzymes dans un gel de polyacrylamide-SDS co-polymérisé avec le substrat de l'enzyme. Dans le cas présent, l'activité hyaluronidasique est mise en évidence par la capacité des hyaluronidases à dégrader l'hyaluronan. Cette dégradation est mise en évidence par une coloration qui révèle des bandes rosées sur fond bleu dont l'intensité est fonction de l'activité présente. Cette technique, bien que semi quantitative, est ici employée pour mettre en évidence une éventuelle différence d'activité hyaluronidasique dans le sérum de patients présentant un polymorphisme au niveau d'*hyal-1* et le sérum de patients « sauvages » pour ce gène. Hyal-1 est considéré, dans l'état actuel des connaissances, comme la seule source d'activité hyaluronidasique dans le sérum.

Protocole de la zymographie :

1) Préparation des gels (gel de séparation et gel d'empilement)

Deux gels sont nécessaires pour la zymographie, un gel d'empilement dévolu au dépôt des échantillons et un gel de séparation de composition similaire au précédent mais légèrement plus concentré en Tris (**Tableau III-7**). Lorsque le gel de séparation est coulé sur son support, il faut laisser polymériser environ 30 minutes avant de couler le gel d'empilement par-dessus.

Tableau III-7: Composition des gels de séparation et d'empilement.

Gel de séparation (pour 2 gels)		Gel d'empilement (pour 2 gels)	
Tris 1.5 M pH 8.8 SDS 0.4%	2.5 ml	Tris 1.5 M pH 6.8 SDS 0.4%	1.25 ml
Acrylamide (30% Acryl/Bis)	4 ml	Acrylamide (30% Acryl/Bis)	0.625 ml
HA 1mg/ml	1.7 ml	H ₂ O	2.75 ml
H ₂ O	1.3 ml	TEMED	5 µl
TEMED	10 µl	Persulfate d'Ammonium (15 mg/1.5 ml H ₂ O)	0.375 ml
Persulfate d'Ammonium (15 mg/1.5 ml H ₂ O)	500 µl		

2) Préparation et dépôt des échantillons

- Mélanger 2 µl d'échantillon dilué 10x dans du NaCl – SDS à 6 µl d'eau et 8 µl de bleu alourdissant.
- Déposer 16 µl d'échantillon par puits.
- Déposer un marqueur de poids moléculaire dans un puits.
- Placer le montage d'électrophorèse dans une cuve Mini-PROTEANII (Biorad), ajouter le tampon d'électrophorèse (Tris 25 mM ; glycine 192 mM ; SDS 0.1% ; pH 8.6) et laisser migrer dans la glace sous un ampérage de 10 mA.

3) Lavage des gels au Triton X100

- Rincer les gels 2 à 3 fois avec de l'eau MilliQ.
- Placer les gels dans 50 ml de Triton X100 pendant 2 heures sous agitation à température ambiante.

4) Incubation du gel en conditions optimales

- Rincer les gels avec de l'eau mq puis placer ceux-ci dans du tampon formate NaCl pendant 30 min à température ambiante et sous agitation.
- Rincer et placer à nouveau les gels dans du tampon formate NaCl sous agitation et à 38°C pendant environ 18 heures.

5) Arrêt de la réaction enzymatique et coloration des gels

- Traiter les gels 2 heures à la pronase.
- Rincer et placer les gels dans la formamide pendant 15 minutes.
- Placer ensuite les gels dans un mélange de 38 ml de formamide (50% H₂O) et 2 ml de colorant Stains All durant 3 jours.

J. Dosage de l'hyaluronan dans le sérum

Principe du dosage :

Ce dosage est un fait un dosage immunoenzymatique de protéine liante qui fait appel à une molécule de capture dénommée protéine liante de l'HA (HABP). Les échantillons à analyser ainsi que des solutions de HA de référence sont incubées dans des microcuvettes recouvertes de HABP afin que le HA présent en solution se lie avec cette dernière. Après enlèvement par lavage des molécules non liées, une solution de HABP conjugué à de la peroxydase du raifort est ajoutée aux microcuvettes pour former des complexes avec le HA préalablement lié. Après une seconde étape de lavage, un substrat chromogène de tétraméthylbenzidine et de peroxyde d'hydrogène est ajouté pour provoquer une réaction colorée. L'intensité de la couleur à 450 nm est mesurée en unités de densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre. Le taux de HA dans des échantillons peut alors être évalué par comparaison avec une droite d'étalonnage préalablement préparée à partir de solutions de référence.

Protocole du dosage :

Le dosage a été effectué avec le kit « Hyaluronic Acid Test » de la firme Corgenix selon le protocole suivant :

- 1) Préparer un litre de solution de Sérum Physiologique Tamponné au Phosphate (30 ml de SPTP + 970 ml H₂O).
- 2) Préparer les échantillons et les solutions de référence pour un double dosage en ajoutant 10 volumes de tampon à 1 volume d'échantillon.
- 3) Déposer 100 µl d'échantillon dilué par micropuits et laisser un puits vide pour le blanc H₂O.
- 4) Incuber 60 minutes à température ambiante.
- 5) Laver 4 fois en remplissant les puits de solution mère SPTP et vider ceux-ci.
- 6) Ajouter 100 µl de solution conjuguée HABP-PR à chaque puits excepté pour le blanc.
- 7) Incuber 30 minutes à température ambiante.
- 8) Laver 4 fois en remplissant les puits de solution mère et vider ceux-ci.
- 9) Ajouter 100 µl de substrat dans chaque cuve et laisser incuber 30 minutes.
- 10) Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (acide sulfurique 0.36N) à chaque cuve pour arrêter la réaction enzymatique.
- 11) Lire l'absorbance en calant le spectrophotomètre à zéro lors de la lecture du blanc eau.

IV. RESULTATS

A. Choix des primers utilisés en PCR

1. Primers utilisés pour l'ADN extrait à partir du sang

La première étape du travail consistait à amplifier des segments d'*hyal-1* et d'*hyal-2*. Initialement, les premiers primers utilisés étaient ceux employés par Barbara Triggs-Raine dans sa recherche de mutations chez un patient déficient en activité hyaluronidasique plasmatique (Triggs-Raine et al., 1999). Parmi les dix couples de primers, huit se sont révélés adéquats pour une recherche de polymorphismes par DHPLC (**Figure IV-2 et IV-3**). Les deux autres couples engendraient des problèmes de spécificité ou une amplification insuffisante pour être utilisés dans cette méthode de chromatographie (**Figure IV-1**). Deux couples d'oligonucléotides (« B » et « D ») ont donc été redéfinis afin de satisfaire aux conditions requises par la DHPLC, à savoir une absence de bandes parasites après la PCR et la production de fragments d'ADN de taille comprise entre 150 et 700 paires de bases.

Les résultats des PCR pour les couples de primers A à E (*hyal-1*) et F à J (*hyal-2*) sont montrés aux **Figures IV-2 et IV-3**. La séquence des primers est donnée dans les Tableaux III-1 et III-2 (Matériel et Méthodes).

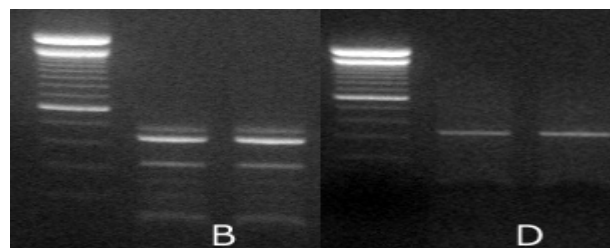


Figure IV-1: Résultats PCR des couples de primers B et D trouvés dans la littérature pour *hyal-1* et posant des problèmes d'amplification.

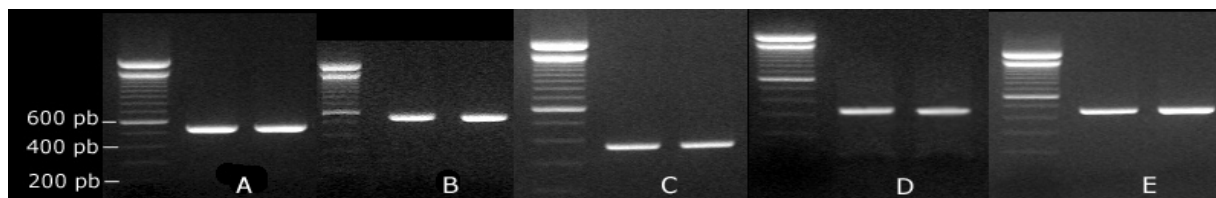


Figure IV-2: Résultats PCR pour les couples de primers définis pour l'amplification des régions codantes d'*hyal-1*.

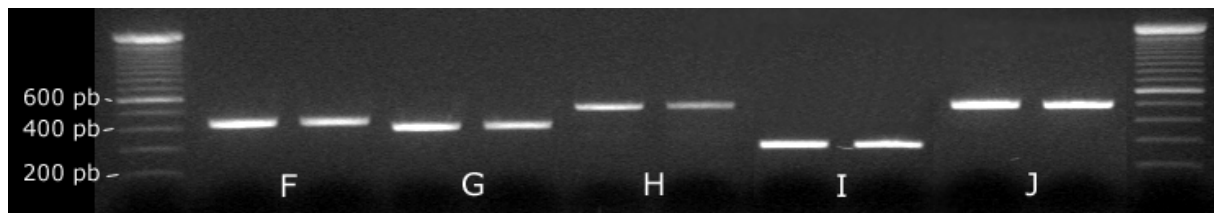


Figure IV-3: Résultats PCR pour les couples de primers définis pour l'amplification des régions codantes d'*hyal-2*.

2. Primers utilisés pour l'ADN extrait à partir de tissus fixés

Lorsque des tissus sont fixés dans le formol et enrobés en paraffine il se passe différentes réactions dans la cellule menant notamment à une fragmentation de l'ADN en segments de taille variable. Les primers employés dans ce travail pour l'amplification d'*hyal-1* et *hyal-2* à partir d'ADN extrait du sang produisent en moyenne des fragments d'une taille d'environ 500 paires de bases. Or, lorsque l'ADN est extrait à partir de tissus enrobés dans la paraffine, grâce au kit TaKaRa DEXPAT™, on peut espérer tout au plus amplifier des fragments d'ADN ayant une taille maximale de 400 paires de bases. Au vu de ces limitations, il a donc été nécessaire de revoir le choix des primers pour une recherche de mutations dans le gène *hyal-2* chez des patients atteints de cancers pulmonaires.

D'après l'expérience accumulée au laboratoire de biologie moléculaire de l'IPG, la meilleure reproductibilité et amplification par PCR est obtenue avec des fragments d'ADN de taille comprise entre 200 et 250 paires de bases. Neuf nouveaux couples d'oligonucléotides (numérotés de 1 à 9) ont donc été définis afin de couvrir l'amplification de l'ensemble des régions codantes d'*hyal-2* (cf. Tableau III-3).

Après essais, ceux-ci se sont révélés corrects pour produire des produits PCR avec une intensité suffisante pour pouvoir être ensuite analysés par DHPLC (Figure IV-4 et IV-5).

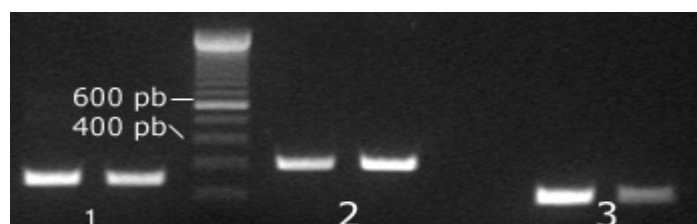


Figure IV-4 : Résultats PCR pour les trois premiers couples de primers définis pour l'amplification des régions codantes d'*hyal-2* lorsque l'ADN est extrait à partir de tissus fixés.

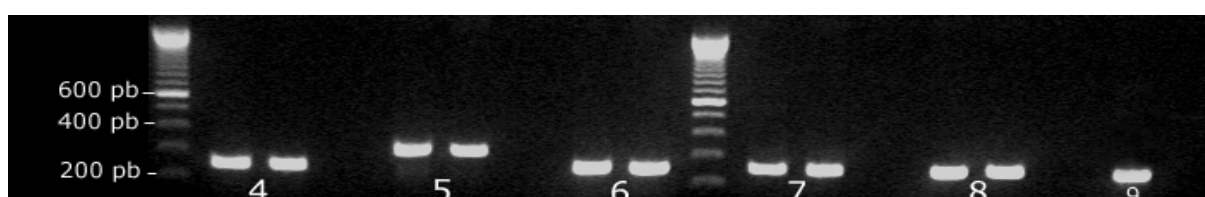


Figure IV-5 : Résultats PCR pour les six derniers couples de primers définis pour l'amplification des régions codantes d'*hyal-2* lorsque l'ADN est extrait à partir de tissus fixés.

3. Séquençage des fragments amplifiés par chaque couple de primers

Afin d'obtenir la certitude que chaque couple d'oligonucléotides amplifie bien la région définie de manière théorique sur chaque gène, un séquençage nucléotidique a été réalisé à la fois pour le primer « sens » et « antisens ». Les résultats des séquençages des 5 fragments amplifiés par les 5 couples de primers utilisés dans l'étude des régions codantes d'*hyal-1* ainsi que celui des 14 fragments d'*hyal-2* (sang et tissus fixés) se sont révélés conformes avec la séquence fournie par la base de données du site www.ensembl.org.

B. Justification du choix de la polymérase

L'analyse par DHPLC nécessite que deux conditions essentielles soient remplies. D'une part, il faut que l'amplification par PCR soit assez intense et d'autre part, il faut que la polymérase soit suffisamment fidèle afin de ne pas produire d'erreurs par incorporation incorrecte. En effet, ce type d'erreurs entraînerait alors l'apparition de fragments PCR incorrects qui perturberaient le signal détecté par la DHPLC.

Le choix de la polymérase s'est porté sur l'Optimase™, une enzyme produite par la firme Transgenomic également à l'origine de la fabrication de la DHPLC. Cette enzyme, assez récente, n'était encore employée qu'à titre d'essais de mise au point dans le laboratoire de biologie moléculaire de l'IPG au moment où j'ai débuté mon mémoire. Afin de justifier l'emploi de cette polymérase, plusieurs tests ont été effectués afin de montrer sa précision et l'avantage de son utilisation dans la détection de polymorphismes par DHPLC par rapport à d'autres polymérases.

L'analyse a été effectuée sur l'exon 7 du gène *P53* avec l'Optimase™, l'Amplitaq Gold™ de la firme Roche et la Fastart Taq™. Après PCR sur de l'ADN extrait de coupes en paraffine, les fragments d'ADN sont analysés par DHPLC aux deux températures d'analyse de l'exon 7, à savoir 61.0°C et 62.7°C (**Figures IV-6 et IV-7**). Les résultats montrent clairement l'avantage procuré par l'Optimase™ sur la Fastart™ qui produit un nombre important d'éléments parasites perturbant ainsi la symétrie du pic de chromatographie. L'Amplitaq Gold™ donne un meilleur résultat que la Fastart™ sans toutefois atteindre la symétrie des pics générés par l'Optimase™.

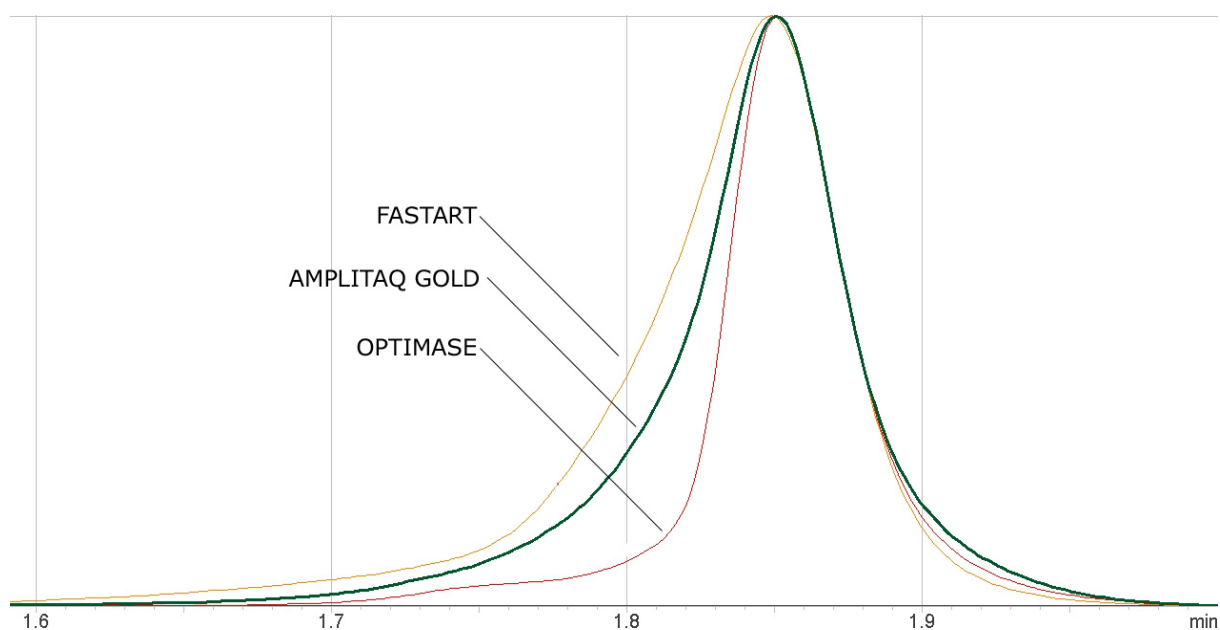


Figure IV-6: Comparaison du signal généré via DHPLC à 61.0°C pour l'amplification de l'exon 7 de *P53* par l'Optimase, l'Amplitaq Gold et la Fastart

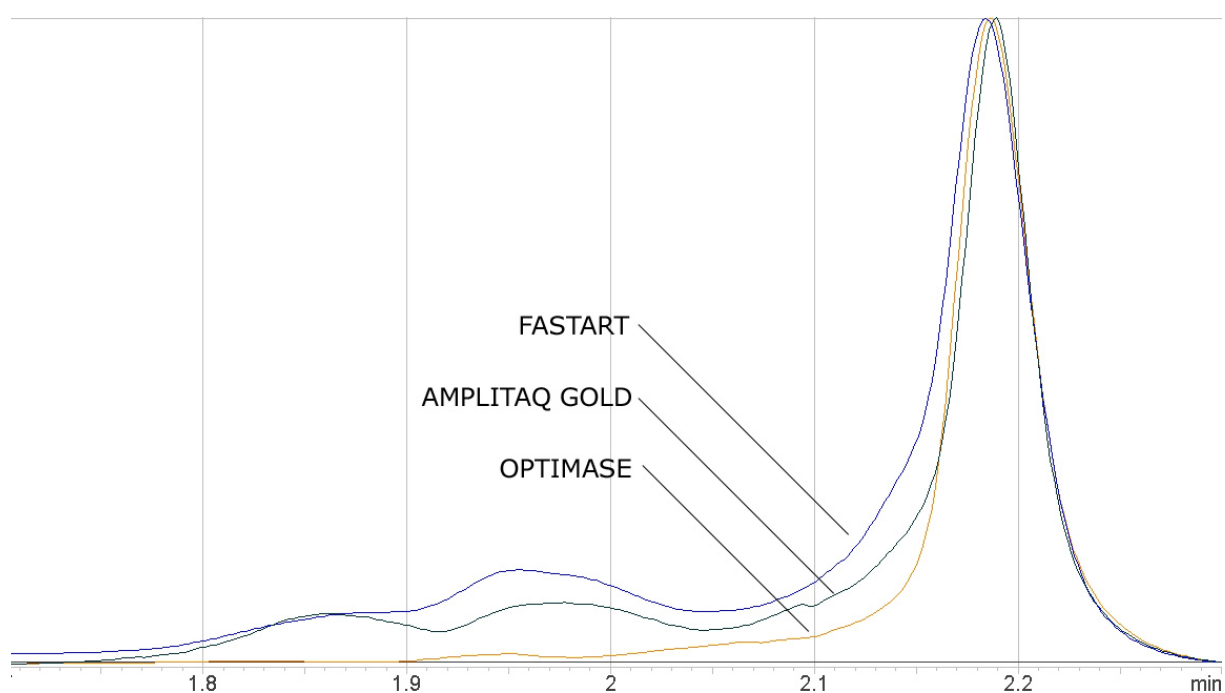


Figure IV-7: Comparaison du signal généré via DHPLC à 62.7°C pour l'amplification de l'exon 7 de *P53* par l'Optimase, l'Amplitaq Gold et la Fastart

C. Recherche de polymorphismes génétiques dans la séquence codante d'*hyal-1* et d'*hyal-2*

Pour effectuer cette recherche, l'ADN de 95 patients a été collecté et stocké sur une plaque 96 puits avec une concentration en ADN de 50 ng/μl. Le 96^{ème} puits est rempli avec de l'eau MilliQ. Lors de chaque PCR précédant l'analyse par DHPLC, la quantité d'ADN nécessaire était prélevée pour chacun des patients et déposée à nouveau sur une plaque de 96 puits. Une PCR était également réalisée sur l'eau afin de s'assurer de l'absence de contaminations. Il faut toutefois signaler que les chromatogrammes qui suivront ne seront pas toujours composés de 95 courbes. En effet, le taux de réussite des PCR atteint rarement 100% et par conséquent certains ADN de patients n'ont pu être amplifiés dans quelques cas.

1. Recherche de polymorphismes au niveau d'*hyal-1*

Le gène *hyal-1* comprend 4 exons et 3 introns pour une taille totale de 3679 paires de bases. La recherche de polymorphismes a été effectuée dans les régions codantes comprises entre le codon start et stop du gène. Les jonctions intron-exon sont également étudiées ainsi que le premier intron. Ce dernier est particulièrement important car il est fréquemment retenu lors de l'épissage alternatif pour générer une protéine inactive (Gatphayak, 2003). Il apparaissait dès lors nécessaire d'étudier également les éventuelles variations nucléotidiques dans cette région d'*hyal-1*. Les fragments seront nommés par la lettre qui correspond à la paire de primers utilisée (A à E pour *hyal-1*).

Les deux premiers fragments étudiés couvrent l'exon 1 à partir du codon de départ ainsi que le premier intron. Pour ces deux fragments du gène *hyal-1*, l'analyse par DHPLC n'a pas révélé la présence de variations génétiques (**Figures IV-8 et IV-9**).

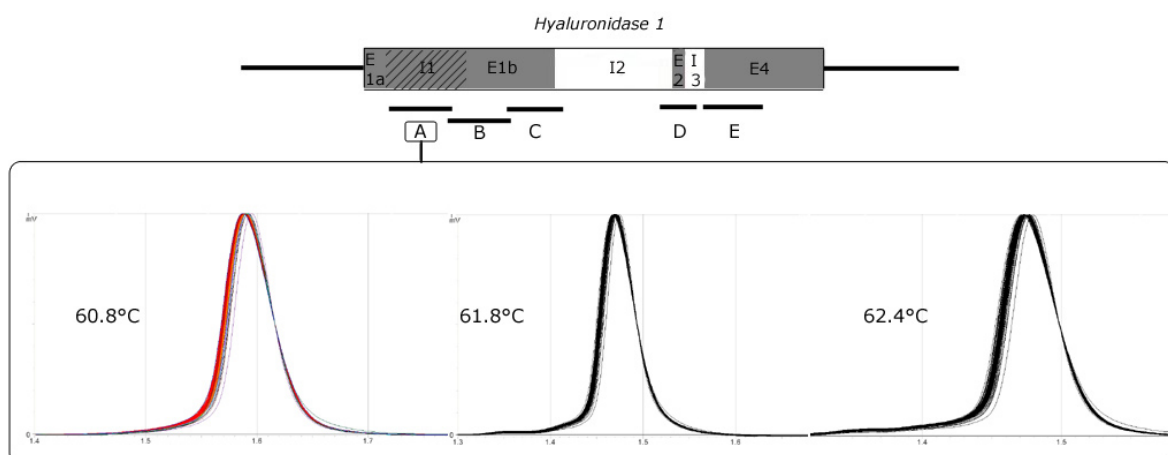


Figure IV-8: Analyse par DHPLC du fragment A d'*hyal-1* aux températures de 60.8, 61.8 et 62.4°C.

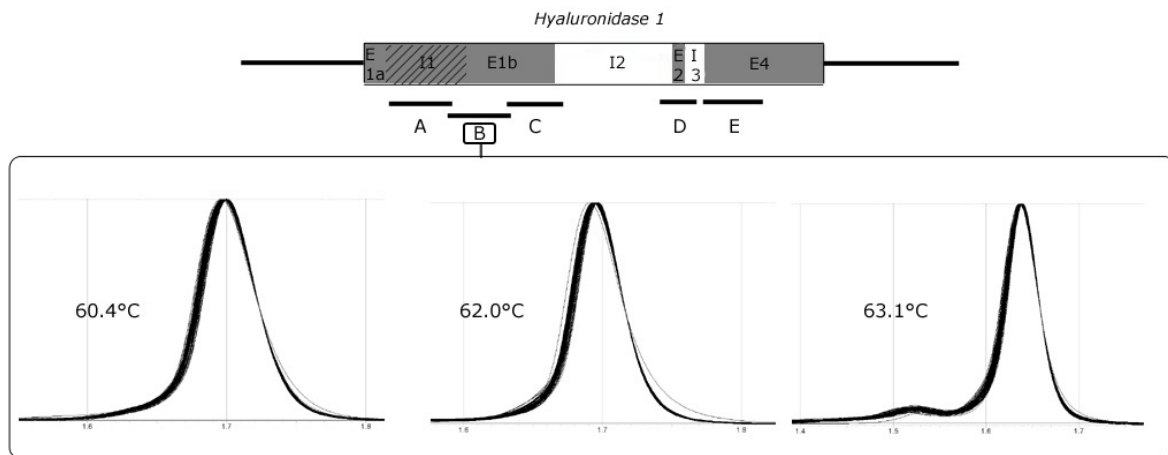


Figure IV-9: Analyse par DHPLC du fragment B d'*hyal-1* aux températures de 60.4, 62.0 et 63.1°C.

Le fragment qui suit, le fragment C, correspond à la partie terminale de l'exon 2 du gène ainsi qu'au début du deuxième intron. Dans cette région, la recherche de polymorphismes s'est révélée fructueuse puisqu'un polymorphisme y a été détecté; il est nettement identifiable aux 3 températures d'analyse par une « cassure » dans le pic qui augmente ainsi sa largeur à la base (**Figure IV-10**). Il sera confirmé et précisé par séquençage (cf. IV-D). Le polymorphisme du fragment C de l'exon 1b d'*hyal-1* apparaît dans la population étudiée avec une fréquence de 9% (7 échantillons sur 79 examinés).

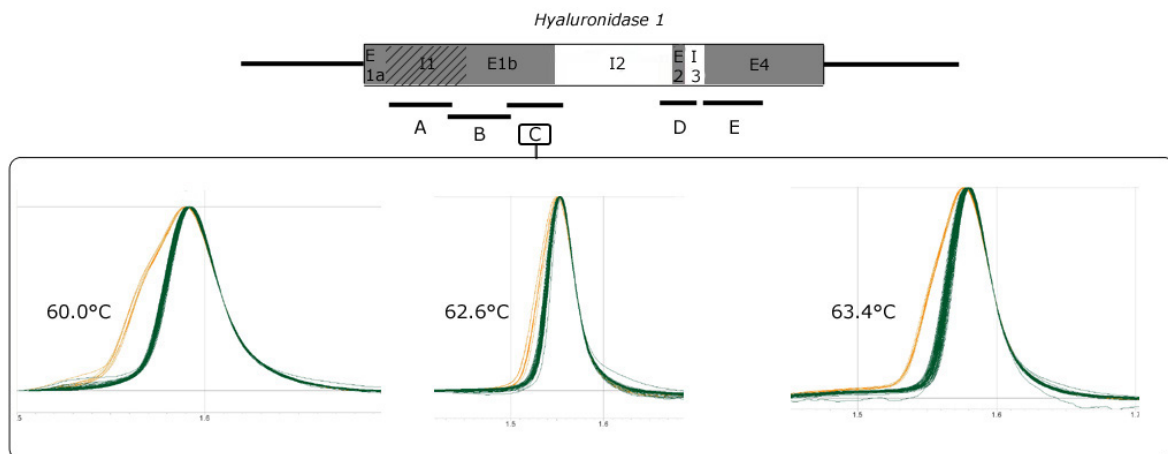


Figure IV-10: Analyse par DHPLC du fragment C d'*hyal-1* aux températures de 60.0, 62.6 et 63.4°C.

Les deux derniers fragments étudiés, D et E, correspondent respectivement à la région de l'exon 2 et au début de l'exon 3 jusqu'au codon stop. Comme pour les deux premiers fragments analysés, aucune variation génétique n'a pu y être mise en évidence (**Figures IV-11 et IV-12**). Ceci clôture la recherche de polymorphismes pour le gène *hyal-1* et porte à un seul le nombre de variations génétiques découvertes malgré l'analyse d'un total de près de 2000 paires de bases par DHPLC.

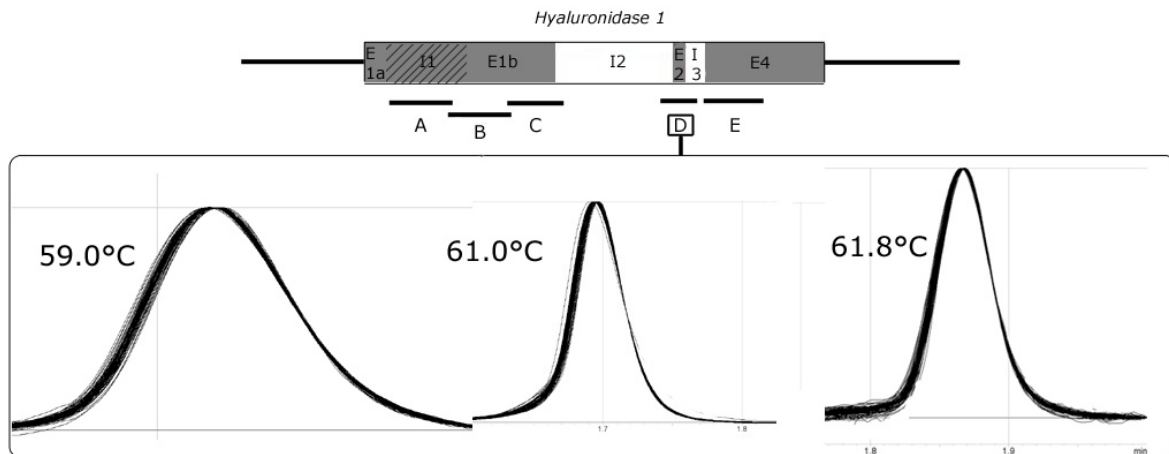


Figure IV-11: Analyse par DHPLC du fragment D d'*hyal-1* aux températures de 60.8, 61.8 et 62.4°C.

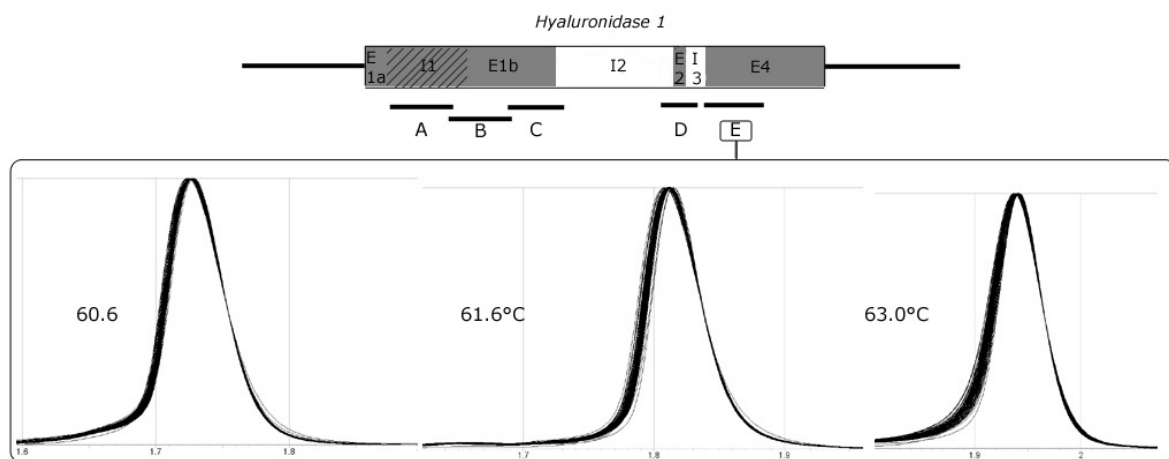


Figure IV-8: Analyse par DHPLC du fragment E d'*hyal-1* aux températures de 60.6, 61.6 et 63.0°C.

2. Recherche de polymorphismes au niveau d'*hyal-2*

Comme son homologue *hyal-1*, le gène *hyal-2* comprend 4 exons pour une taille totale de 4902 paires de bases (un tiers plus long qu'*hyal-1*). La recherche de polymorphismes a également été effectuée au niveau des régions codantes comprises entre le codon start situé au début de l'exon 2 et le codon stop situé à l'extrémité de l'exon 4. Pour couvrir ces régions, 5 fragments (F à J) ont été générés par PCR et analysés par DHPLC.

Le premier fragment étudié (F) au niveau d'*hyal-2* est l'exon 2 contenant le codon de départ de ce gène. L'analyse par DHPLC montre à la température de 64°C, et dans une moindre mesure à 59.4°C, deux profils de courbe différents (**Figure IV-13**). Cette variation est très fréquente. En effet, 35 patients sur 83 en sont porteurs, ce qui représente une fréquence dans la population étudiée d'environ 42%.

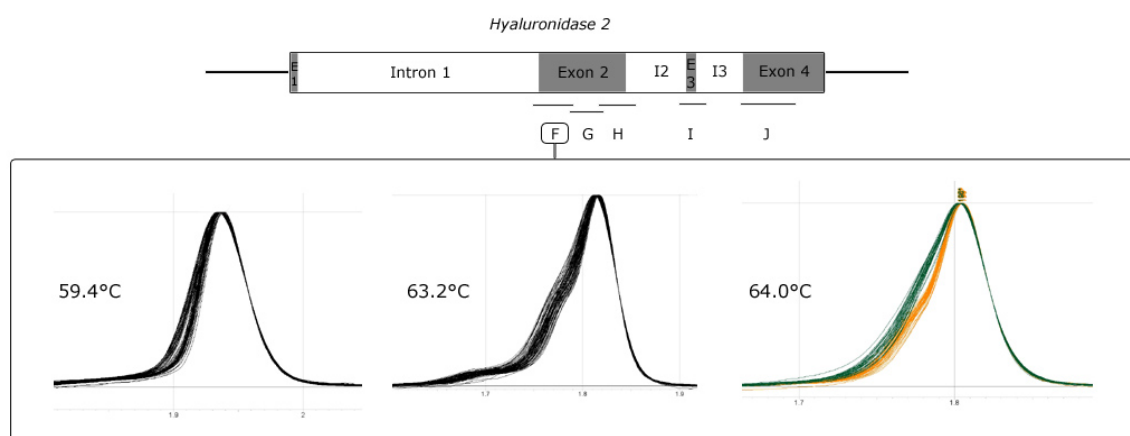


Figure IV-13: Analyse par DHPLC du fragment F d'*hyal-2* aux températures de 59.4, 63.2 et 64.0°C.

L'étude du fragment G, qui correspond à la partie centrale de l'exon 2, n'a pas révélé de variations génétiques bien que l'on observe deux courbes légèrement décalées sur la gauche pour la température de 63.6°C (**Figure IV-14**). Ce genre d'artefact est généralement dû à une PCR qui a moins bien fonctionné, ce qui se traduit par un signal beaucoup moins intense. Cette intensité moindre par rapport aux autres échantillons est alors remarquée par un léger décalage, vers la gauche ou vers la droite, du pic généré par rapport aux courbes des échantillons dont l'intensité du signal est suffisante.

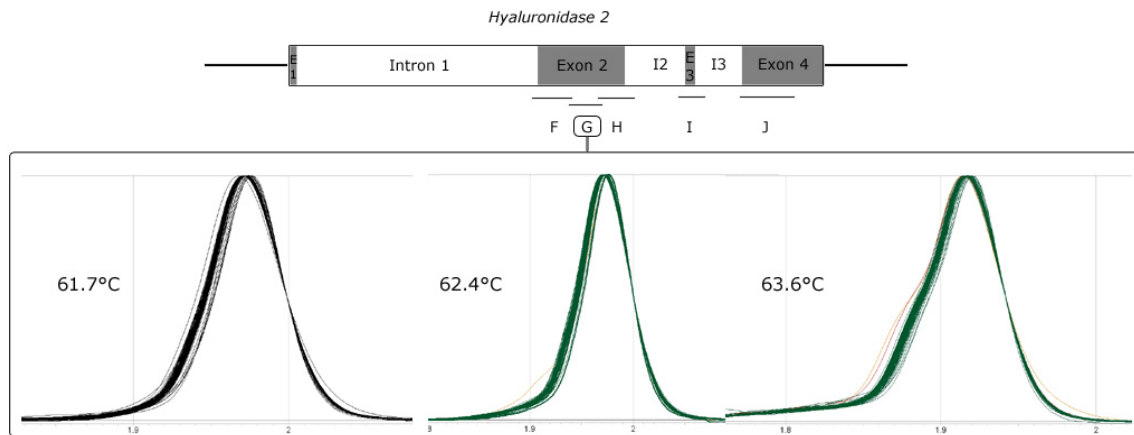


Figure IV-14: Analyse par DHPLC du fragment G d'*hyal-2* aux températures de 61.7, 62.4 et 63.6°C.

Comme pour le fragment précédent, le fragment H qui suit et correspond à la partie terminale de l'exon 2, ne s'est pas révélé être le lieu d'une variation génétique (**Figure IV-15**).

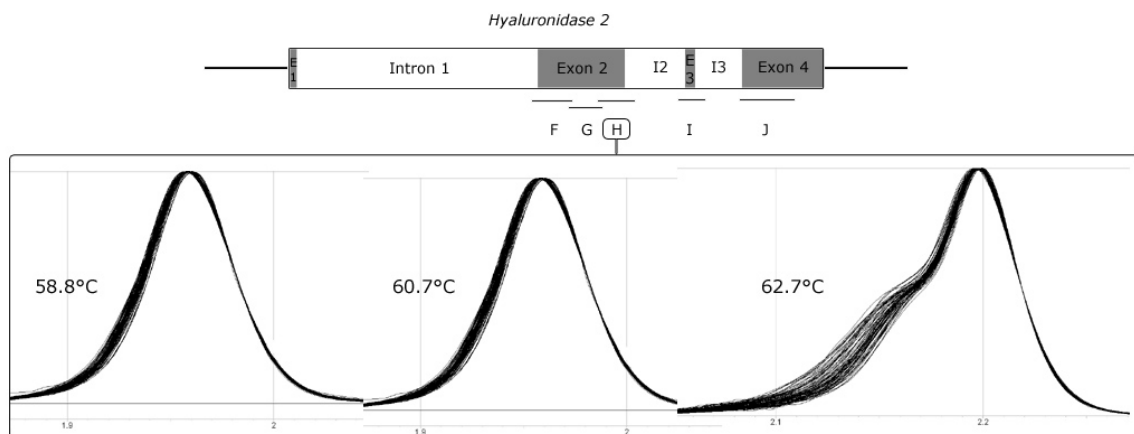


Figure IV-15: Analyse par DHPLC du fragment H d'*hyal-2* aux températures de 58.8, 60.7 et 62.7°C.

L'avant-dernier fragment (I) est celui qui recouvre l'exon 3. Celui-ci est un petit exon de 90 paires de bases dont la séquence est fortement conservée entre la souris, l'homme et *X. Laevis*.

Une variation est découverte ; elle n'est visible qu'aux plus hautes températures, à savoir 64°C et 66°C (**Figure IV-16**). Ceci indique que la variation génétique est présente dans une région « chaude » du fragment, qui est probablement située dans une région riche en GC puisqu'il faut chauffer fortement ce fragment pour le dénaturer. Le chromatogramme montre que cette variante est présente chez deux patients sur un total de 91 (2.2%).

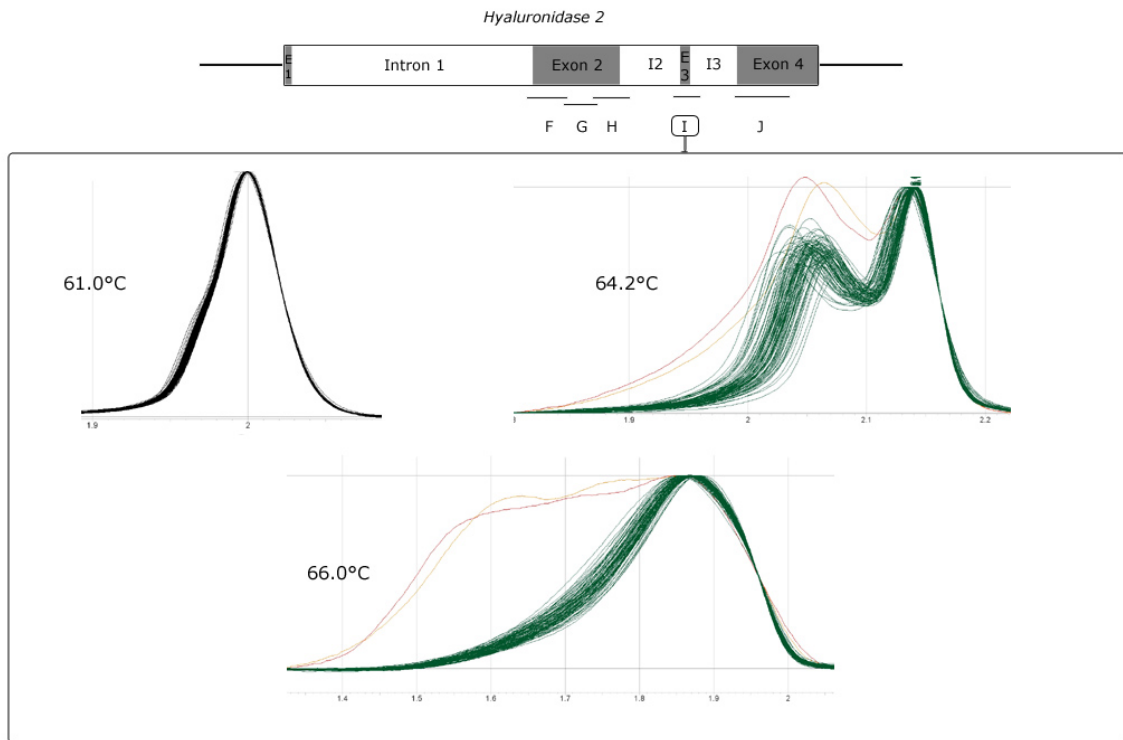


Figure IV-16: Analyse par DHPLC du fragment I d'*hyal-2* aux températures de 61.0, 64.2 et 66.0°C.

Le dernier fragment analysé, le fragment J, recouvre la jonction intron 3 – exon 4 ainsi que le début de cet exon jusqu'au codon stop. Ici aussi, une variation génétique rare a pu être mise en évidence et ce aux trois températures d'analyse (**Figure IV-17**). Un seul patient sur un total de 81 est porteur de cette variation, ce qui porte la fréquence de celle-ci à 1.2%.

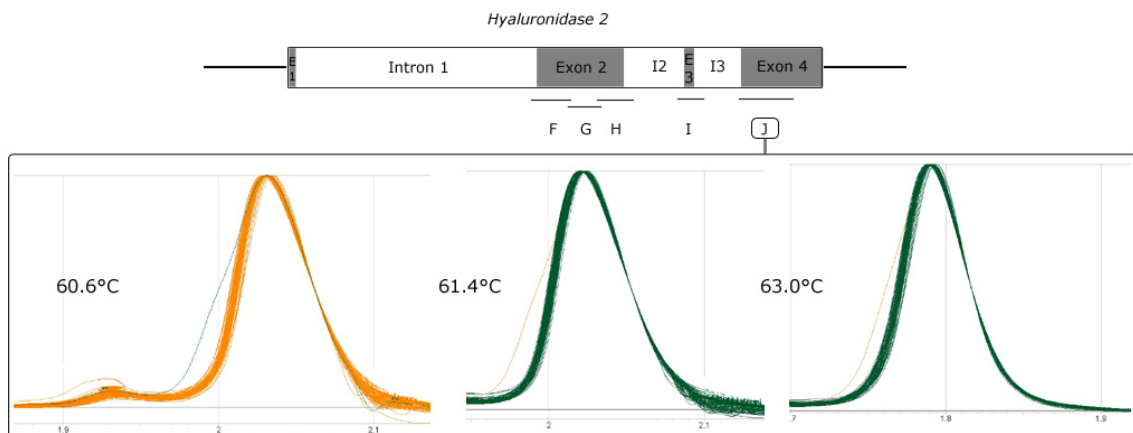


Figure IV-17: Analyse par DHPLC du fragment J d'*hyal-2* aux températures de 60.6, 61.4 et 63.0°C.

D. Séquençage des polymorphes découverts et comparaison des séquences avec la forme sauvage correspondante

1. Polymorphisme au niveau du fragment C de l'exon 1b d'*hyal-1*

Le séquençage confirme la présence d'un polymorphisme au niveau du fragment C de l'exon 1b d'*hyal-1* (**Figure IV-18**). En effet, au niveau de la séquence du polymorphe, on retrouve entre les nucléotides 120 et 130 deux pics superposés d'intensité moindre que le pic correspondant dans la séquence de la forme sauvage. Ces deux pics reflètent la présence de la forme sauvage et de la forme polymorphe dans l'échantillon séquencé. Le polymorphisme observé ici correspond à la substitution d'une Guanine par une Adénine en position 766 à partir de l'ATG de départ sur l'ADNc et entraîne l'apparition d'un changement d'acide aminé. En effet, l'acide aminé présent à cet endroit dans la forme sauvage correspond à une glycine (GGG), tandis que la forme polymorphe présente une arginine (AGG).

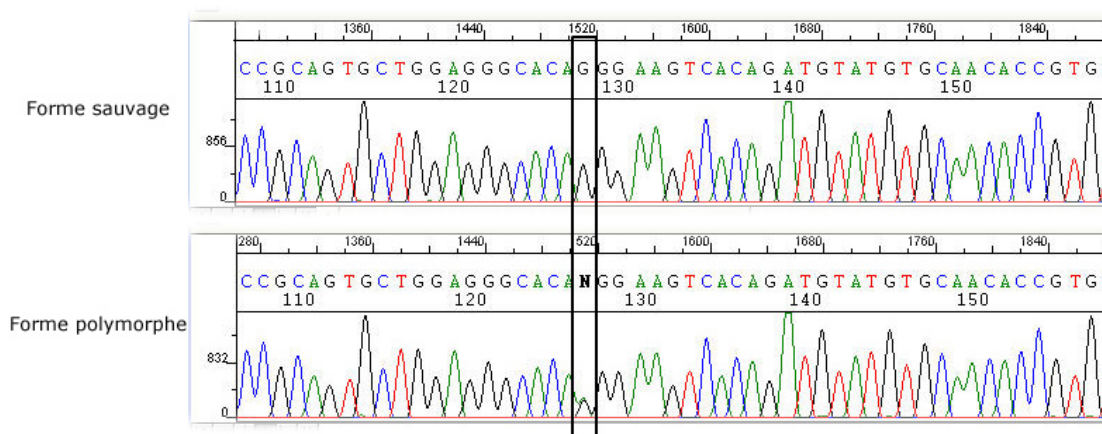


Figure IV-18: Résultat partiel du séquençage du fragment C du gène *hyal-1*.

2. Polymorphisme au niveau du fragment F de l'exon 2 d'*hyal-2*

Ce polymorphisme présent dans la population étudiée à une fréquence de 42% correspond à la substitution d'une guanine par une thymine (**Figure IV-19**). Cette substitution survient au niveau du 52^{ème} nucléotide de l'ADNc après l'ATG de départ. Cette substitution n'est pas neutre puisqu'elle entraîne le remplacement d'une alanine (GCA) par une sérine (TCA).

Au vu de la fréquence élevée de ce polymorphisme, nous avons également décidé de rechercher la fréquence d'homozygotie de celui-ci dans la population. Cependant, malgré l'analyse d'une cinquantaine de patients, nous n'avons pas pu mettre en évidence des patients homozygotes pour ce variant.

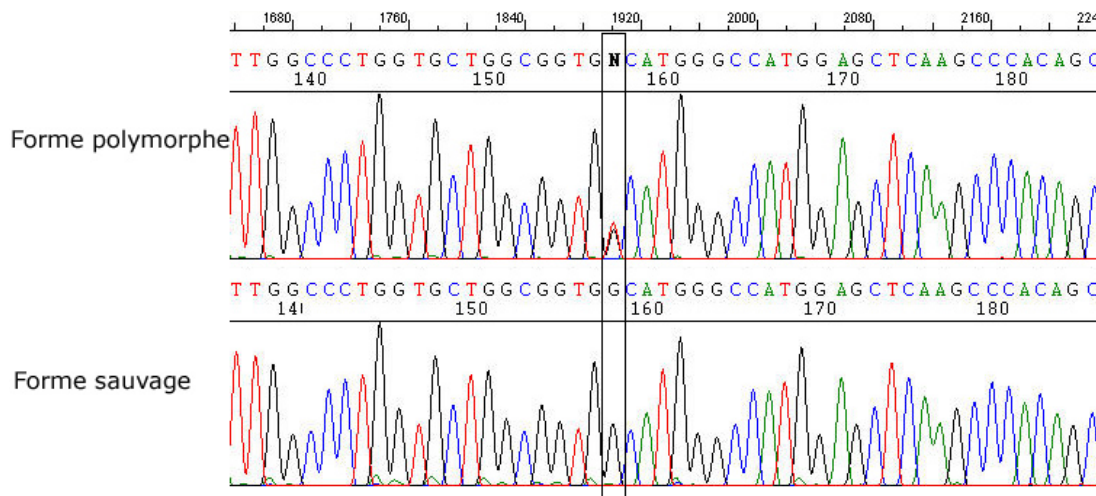


Figure IV-19: Résultat partiel du séquençage du fragment F du gène *hyal-2*.

3. Polymorphisme au niveau du fragment I de l'exon 3 d'*hyal-2*

Le polymorphisme découvert dans ce petit exon de 90 paires de bases n'apparaît que dans 2% de la population. Le séquençage de cette région d'ADN chez les deux patients porteurs de ce polymorphisme montre une substitution d'une cytosine par une thymine en position 962 sur l'ADNc après l'ATG de départ (**Figure IV-20**). Contrairement aux polymorphismes précédents, on n'observe pas de changement d'acide aminé. En effet, les codons GGC et GGT respectivement présents au niveau de la forme sauvage et polymorphe codent tout deux pour une glycine.

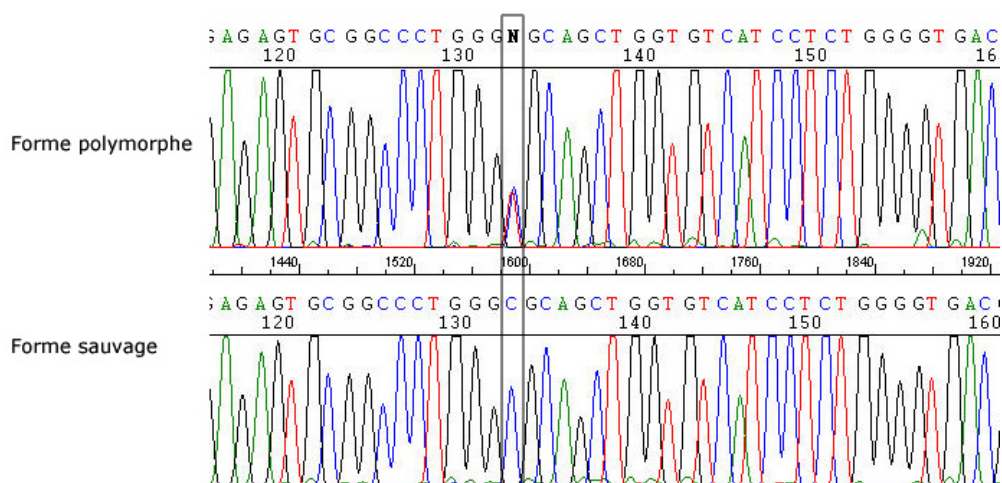


Figure IV-20: Résultat partiel du séquençage du fragment I du gène *hyal-2*.

4. Polymorphisme au niveau du fragment J de l'exon 4 d'*hyal-2*

Ce polymorphisme rare (1%) est le dernier identifié pour le gène *hyal-2* (**Figure IV-21**). Il correspond à la substitution d'une adénine par une cytosine. Située au 1252^{ème} nucléotide après l'ATG de départ sur l'ADNc d'*hyal-2*, cette substitution entraîne l'apparition d'une phénylalanine (TTT) en lieu et place de l'isoleucine (ATT) présente dans la forme sauvage.

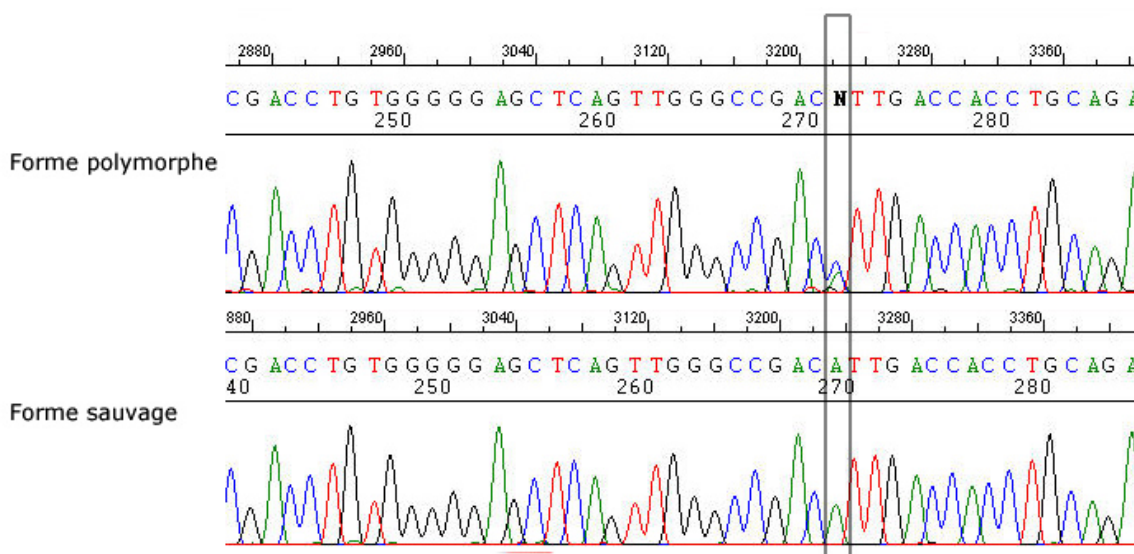


Figure IV-21: Résultat partiel du séquençage du fragment J du gène *hyal-2*.

5. Position des acides aminés modifiés par les polymorphismes

Un alignement de séquence (**Figure IV-22**) entre *hyal-2* de *xenopus laevis*, de souris et d'homme ainsi qu'*hyal-1* et PH20 humains est utilisé ici afin d'obtenir une indication quant à l'importance des acides aminés modifiés par les polymorphismes découverts pour *hyal-1* et *hyal-2*. Lorsque l'on observe cet alignement de séquence, on remarque que seul le polymorphisme présent au niveau du fragment I de l'exon 3 est situé dans une région de la protéine qui est fortement conservée. En effet, on retrouve dans cette région une glycine pour les cinq séquences comparées. Cela pourrait expliquer la découverte à cet endroit d'une mutation silencieuse plutôt qu'une mutation menant à un changement d'acide aminé, si cette glycine est essentielle au bon fonctionnement de l'enzyme. Pour les autres polymorphismes, on ne retrouve pas une forte conservation où ils sont situés. Tout au plus, l'acide aminé est conservé entre deux espèces. Ceci est notamment le cas du polymorphisme présent au niveau du fragment F d'*hyal-2* où l'on retrouve une conservation de l'alanine entre les séquences de l'*hyal-2* humaine et murine.

Localisation du polymorphisme du fragment F d'hyal-2

MPCCLTFLWLFLGAAANA/CLSDSWMNKPTFRPVFTRRPF
MRAGLGPIITLALVLEANA/GELKPTAPPIFTGRPF
MRAGPGPTVTLALVLANA/MELKPTAPPIFTGRPF
MAGHLLPICALFITLLDMAQG/FRGFLVPNRPF
MGVLKFKHIFFRSFKSSGVSQIVFTFLLPCCLT/LNFRAPPVFINVAF

IIAWNAPTQDCPPREFVHLDLKLFDLNASPNEGFDQNLTFYKBRLGMY
VVAWNVPTQECAPRHKVPLDLRAFDVKATPNEGFBQNIITTFYYDRGLGY
VVAWDVPTQDCGPRIKVPLDLNAFDVQASPNEGFDVQNIITTFYDRGLGY
TTVWNANTQWCLERHGVDDVSVFVDVANFGQTERGPDMTIFYSSQLGTY
LVAWNAPSEFCLGKFDEPLDMSLSFSGSPRINATGQGVTFYVDRGLGY

* *

PYYDE.HGGPVAGGLPQNASLRAHLDKLPEGIQKYIRSRDRDGLAVIDWE
PRFDA.AGTSVHGGVPQNGSLCAHLPMLKESVERYIQTOEPGGGLAVIDWE
PRFDS.AGRSVHGGVPQNVSLWAHRKMLQKRVEHYIRTQESAGLAVIDWE
PYYTP.TGEPVFGGLPQNASLIAHLARTFQDILAAIPAPDFSGLAVIDWE
PYIDSITGVTVNGGIPQKISLQDHLKAKKDITFYMPVDNL.GMAVIDWE

EWRPFWRNWQTKNVYRNNRNVLVASRHPSWSREQVEKESLYDFENAARE
EWRPVWVRNWQEKDVYRQSSRQLVASRHPDWPSDRVMKQAYEFFAARQ
DWRPVWVRNWQDKDVYRRLSRQLVASRHPDWPPDRIVKQAYEFFAAQ
AWRPRWAFNWDTKDIYRQSRALVQACHPDWPAPQVEAVAQDQFOGAARA
EWRPFWARNWPKPDVYKNRSIELVQQQNVQLSLTEATEKAKQEFKAGKD

FMAETLRHAKTTTRPQLWGFYLFPCDYNHDYIKNRESYTGQCPDVEISR
FMLNTRLRYVKAVRPHLWGFYLFPCDYNHDYVQNWESYTGRCPDVEVAR
FMLETLRVYKAVRPHLWGFYLFPCDYNHDYVQNWESYTGRCPDVEVAR
WMAGTLQLGGLRPRGLWGFYGFPCDYN..YDFLSPNYTGQCPDSGIRACN
ELVETIKLGLLRPNHLWGFYLFPCDYNHKKP..GYNGSCFNVEIKRN

Localisation du polymorphisme du fragment C d'hyal-1

DQLSWLWEKSTALYPSIYVLGQVLRRLRTGRKFVRSRVREAMRISYRHHKD
DQLAWLWAESTALFPSVYLDETLASSVHSRNFVSFRVREALRVARTHAN
DQLAWLWAESTALFPSVYLDETLASSLHGRNFVSFRVCEALRVARTHAN
DQLGLWQSRALYPSIYMPAVLEGTGKSQMYVQHRVAEAFRVA.VAAGD
DDLWLWNESTALYPSIYL.NTQOSEVAATLYVRNVRREAIRVSKIPIAK

Localisation du polymorphisme du fragment I d'hyal-2

E2/E3

YSLPVEVYTRPTYIRKLD.FLSQMDLISTIGESAAAGAGVIEWGDABYT
HALPVYVTRPTYTRG.LTGLSQVDLISTIGESAAAGAGVIEWGDSEDA
HALPVYVTRPTYSR.LTGLSQMDLISTIGESAAAGAGVILWGDAGYT
PNLPVLPYVQIFY.DTTNHFLPLDEHSLGESAAAGAGVVLWVSWENT
SPLPVFAYTRIVFTDQVLKFLSODELVYTFGETVAIGASGIVINGTLSIM

E3/E4

KSKETCOMIKRYLEEDLGRYIVNVTTAELCSQSLCNGNRCRLRQDNITD
SSLETQCYLKNYLTQLLPYVNVSWATQYCSWTQCHGHGRCVRRNPSAN
TSLETQCYLKDYLTRLVPYVNVSWATQYCSRAQCHGHG.CVPCGNPSAS
RTKESQAIKEYMDTTLGPFILNVTSGALLCSQALCSGHGRCVRRTSHPK
RSMKSCLLLDNYMETILNPYIINVTLAAMCSQVLCQEQGVCIKKNWNS

Localisation du polymorphisme du fragment J d'hyal-2

AFLHLNSANFQIVSAPKDSQGPSLRAEGKLSAEDJAVLRSQFRCQCYVDW
TFLHLNASSFRLVPGHTFSE.PQLRPEGQLSEADINYLQKHFRQCQCYLGW
TFLHLSTNSFRLVPGHAPGE.PQLRPEVGEISWADJDLQTHFRQCQCYLGW
ALLLNPFASFISI.QLTPGGG.P.LSLRGALSLEDQAMAVEFKRCRCYFGW
DYLHLNPDNFAI.QLEKGGK.FTVRGKPTLE..DLQFSEKFYCSYSTL

YGDSCGFQRRRTNGGAVATGPGCFVLVVSLLVALILALL.....XlHyal-2
GGEQCQRNYKGAAGNASRAWAGSHLTSLLGLVAVALTWTL...MmHyal-2
SGEQCQWDHRCQAGANEAWAGSHLTSLLALALAFWTL...HsHyal-2
QAPWCERKSMW.....HsHyal-1
SCKEKADVKTDAVDVCIADGVCIDAFKPPMETEEPQ.....HsPH-20

Figure IV-22 : Alignements des séquences d'hyal-2 humains, murins et de X. Laevis, ainsi que d'hyal-1 et de PH20 humains

6. Résumé des polymorphismes identifiés au niveau des gènes *hyal-1* et *hyal-2*

Pour rappel, un seul polymorphisme a été découvert au niveau d'*hyal-1* (**Figure IV-23**) tandis qu'il en a été découvert trois au niveau d'*hyal-2* (**Figure IV-24**). Ces quatre polymorphismes (**Tableau IV-1**) sont des SNP puisque dans tous les cas on observe la substitution d'un nucléotide par un autre. Sur ces quatre SNP, trois d'entre eux engendrent l'apparition de mutations missense puisqu'il y a substitution d'un acide aminé par un autre. Le quatrième SNP, lui, crée l'apparition d'une mutation silencieuse.

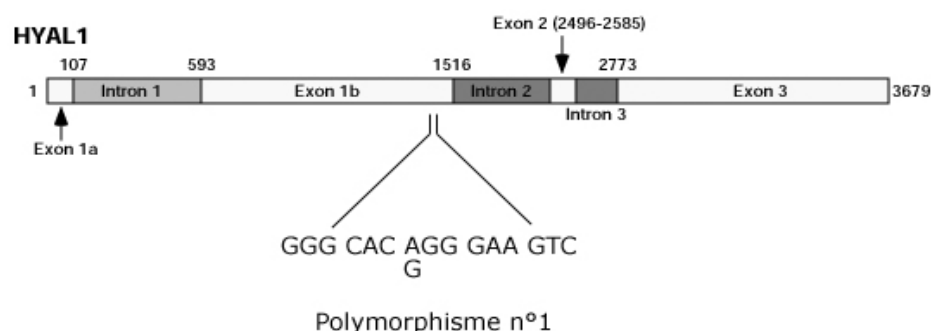


Figure IV-23: Schéma représentant la position du polymorphisme découvert dans le gène *hyal-1*.

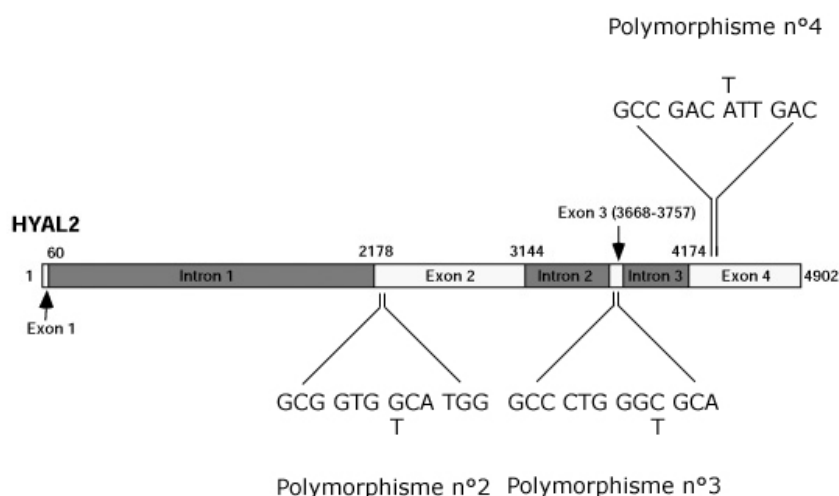


Figure IV-24: Schéma représentant les positions des polymorphismes découverts dans le gène *hyal-2*.

Tableau IV-1: Résumé des polymorphismes découverts pour les gènes *hyal-1* et *hyal-2*.

Polymorphisme n°	Gène	Exon	Fréquence approximative	Type de polymorphisme	Mutation engendrée
1	hyal-1	1b	9%	SNP	missense
2	hyal-2	2	42%	SNP	missense
3	hyal-2	3	2%	SNP	silencieuse
4	hyal-2	4	1%	SNP	missense

E. Comparaison des polymorphismes identifiés avec ceux de la base de SNP du NCBI

La base de SNP du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>) contenait à l'époque de mon mémoire plusieurs références de polymorphismes attribués à *hyal-1* et *hyal-2*. La plupart de ces polymorphismes sont issus des séquençages effectués lors du projet de séquençage du génome humain et correspondent souvent à des erreurs de séquençage. Lorsque l'on compare les résultats disponibles dans cette base de SNP avec ceux obtenus dans ce mémoire, on constate qu'un seul polymorphisme est commun. C'est celui qui est situé au niveau de l'exon 2 d'*hyal-2* ; il est confirmé par plusieurs sources de données. Les autres polymorphismes référencés par la base (3 pour les régions codantes d'*hyal-1* et 3 pour celles d'*hyal-2*) n'ont pas été retrouvés dans le cadre de ce travail. Inversement, les trois autres polymorphismes découverts ici (l'un chez *hyal-1* et deux chez *hyal-2*) ne sont pas mentionnés dans la base de SNP du NCBI.

F. Evaluation de l'activité enzymatique d'hyal-1 dans le sérum

Afin de déterminer si la présence d'un polymorphisme au niveau d'*hyal-1* chez certains patients influence l'activité hyaluronidasique dans le sang, une zymographie a été réalisée sur 10 échantillons. Les 5 premiers proviennent du sérum de patients porteurs du polymorphisme découvert dans le gène *hyal-1* tandis que les 5 suivants proviennent de patients ne présentant aucun polymorphisme. Rappelons qu'à l'heure actuelle *hyal-1* est considérée comme la seule source d'activité hyaluronidasique du plasma. Par conséquent, l'expérience n'a pas été menée pour des patients porteurs de polymorphismes au niveau d'*hyal-2*.

Les résultats présentés dans les **Figures IV-25 et IV-26** montrent une activité enzymatique généralement située aux alentours d'un poids moléculaire de 75 kDa sous forme de deux bandes distinctes et d'intensités différentes. Cependant, on ne constate aucune différence significative entre les échantillons des patients porteurs du polymorphisme et les autres, si ce n'est un signal légèrement plus faible dans le sérum des patients P1 et P2. La signification de cette observation est incertaine.

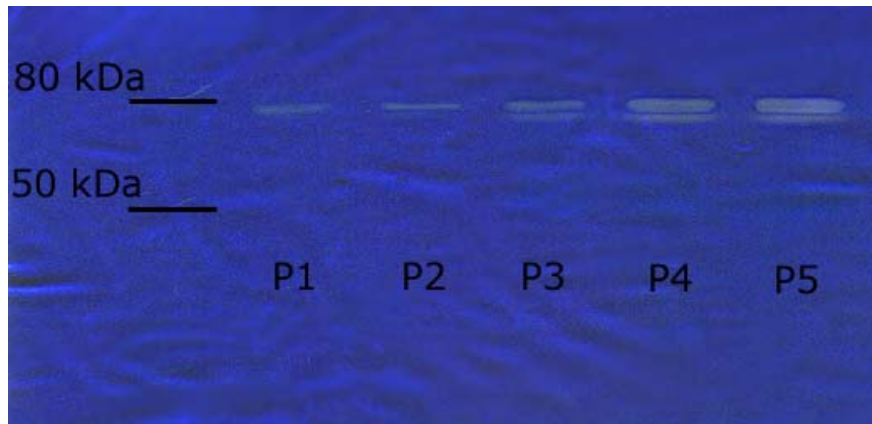


Figure IV-25: Zymographie de 5 patients (P1 à P5) porteurs du polymorphisme découvert au niveau d'*hyal-1*.

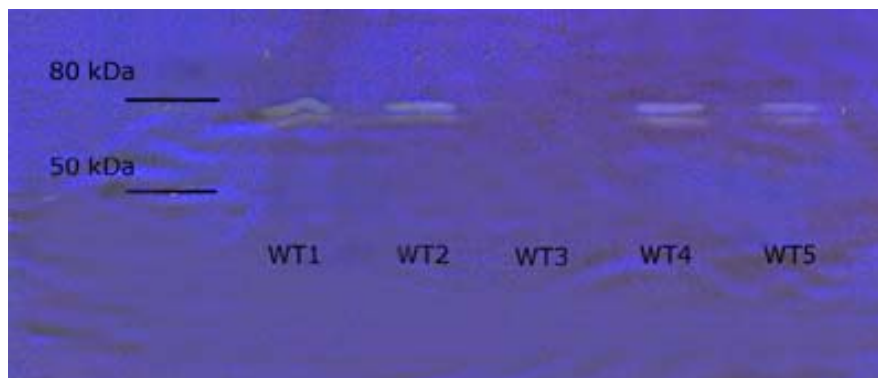


Figure IV-26: Zymographie de 5 patients (WT1 à WT5) non porteurs du polymorphisme découvert au niveau d'*hyal-1*. Aucune activité hyaluronidasique n'a pu être mise en évidence pour WT3.

G. Dosage de l'hyaluronan dans le sérum

Une autre manière d'évaluer si la présence d'un polymorphisme au niveau d'*hyal-1* a une influence sur la dégradation de l'hyaluronan est de doser l'hyaluronan dans le sérum. Pour cela, un dosage immunoenzymatique a été réalisé sur le sérum des 10 mêmes patients pour lesquels une zymographie a été effectuée. Avant de pouvoir mesurer la quantité d'hyaluronan dans le sérum, il est nécessaire d'établir au préalable une droite d'étalonnage. Celle-ci est réalisée au moyen de solutions standardisées contenant différentes concentrations connues d'hyaluronan (**Figure IV-27**).

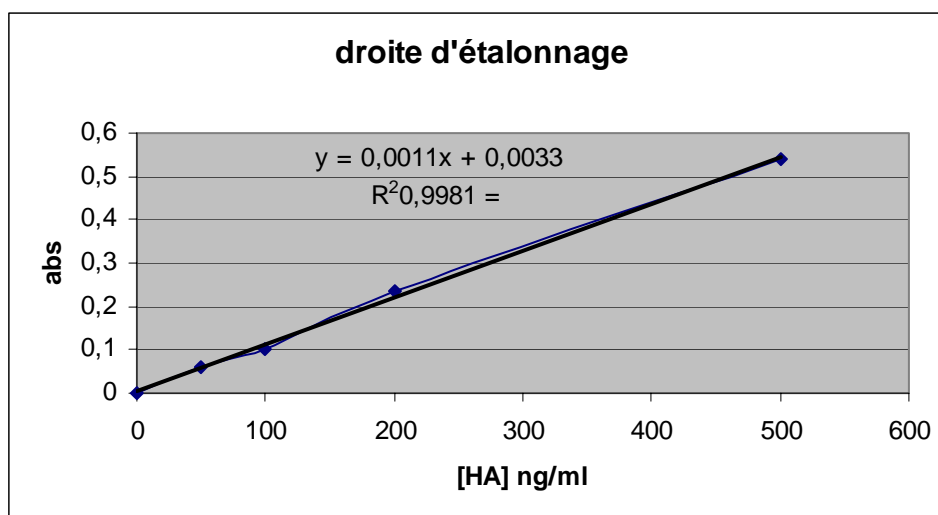


Figure IV-27: Droite d'étalonnage établie par la mesure de l'absorbance en fonction de la concentration en hyaluronan de standards de 0, 50, 100, 200 et 500 ng/ml.

Les résultats obtenus par calcul à partir de la droite d'étalonnage montrent, pour tous les échantillons, une valeur très faible, voire négative, de la concentration d'hyaluronan sérique (**Tableau IV-2**). Il n'y a pas de différence entre le sérum des patients porteurs du polymorphisme au niveau d'*hyal-1* et les patients sauvages pour ce même gène.

Tableau IV-2: Absorbance moyenne (moyenne réalisée sur deux mesures par échantillon) et calcul des concentrations en hyaluronan pour chacun des dix sérums testés.

Sérum	Absorbance	Concentration en HA (ng/ml)
1p	0,015	10,18
2p	-0,012	-13,91
3p	-0,014	-16,05
4p	-0,013	-14,82
5p	-0,017	-18,45
6wt	0,008	3,82
7wt	-0,018	-18,91
8wt	0,005	1,09
9wt	-0,014	-15,27
10wt	-0,010	-12,09

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer ces concentrations en hyaluronan proches de 0 ng/ml. Premièrement, il faut savoir que la valeur normale de la concentration en hyaluronan dans le sérum de patients sains est comprise entre 0 et 75 ng/ml (Laurent, 1998). Deuxièmement, les sérums utilisés proviennent de sangs ayant séjournés plusieurs heures à température ambiante. En effet, après la prise de sang, réalisée en milieu hospitalier ou dans des centres dévolus aux prises de sang, celui-ci suit un cheminement variable de plusieurs heures avant que l'on puisse y récupérer le sérum et congeler ce dernier à -80°C . Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la concentration d'hyaluronan serait influencée par ces conditions de conservation, nous avons dosé le sérum d'un patient dont le sang a été conservé dans plusieurs conditions. Une première fraction du sérum collecté a été directement placée à 4°C après la prise de sang avant d'être dosée, tandis que la deuxième fraction a été dosée après être restée respectivement 12 et 24 heures à température ambiante. Les résultats de cette expérience montrent que l'hyaluronan est bien quantifiable dans ces conditions puisqu'il a été mesuré des valeurs de 86, 90 et 99 ng/ml d'hyaluronan pour des périodes de stockage du sérum de 0, 12 et 24 heures à température ambiante. Ceci montre que l'hyaluronan reste stable dans ces conditions de conservation. L'échec de l'expérience effectuée initialement doit donc être due à d'autres facteurs qui n'ont pu être déterminés ici.

H. Recherche de mutations au niveau d'*hyal-2* dans des carcinomes pulmonaires

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les hyaluronidases sont suspectées d'être impliquées dans le développement de nombreux cancers et notamment les cancers pulmonaires. Ces derniers pouvaient facilement être étudiés puisque l'IPG dispose d'une importante banque de tissus tumoraux fixés et conservés sous forme de coupes en paraffine.

Avant de rechercher la présence d'éventuelles mutations au niveau d'*hyal-2* dans des carcinomes pulmonaires, il fallait valider la méthode de détection de mutations par DHPLC sur de l'ADN extrait à partir de tissus conservés dans la paraffine. En effet, si la fixation au formol suivie de l'enrobage en paraffine permet une bonne conservation générale des tissus, il résulte tout de même de cette méthode de conservation quelques inconvénients. Parmi ceux-ci, on retrouve la fragmentation de l'ADN en fragments de taille variable, ce qui a pour conséquence de limiter les possibilités et la reproductibilité d'amplification par PCR. Au-delà de 400 paires de base, l'amplification devient aléatoire et il devient difficile d'obtenir des résultats reproductibles d'un échantillon à l'autre. De plus, lors de l'extraction, on peut, en plus de l'ADN, récolter des éléments parasites qui vont perturber le fonctionnement de la polymérase et engendrer des produits PCR dont l'intensité peut varier fortement d'un échantillon à l'autre. Bien évidemment, cette variabilité obtenue lors de la PCR aura des répercussions sur la qualité des pics obtenus lors du passage des échantillons sur la DHPLC, ce qui rendra nettement plus difficile l'interprétation des résultats.

Pour valider cette détection, il a d'abord été décidé de rechercher la présence de mutations au niveau de l'exon 7 du gène *P53*. Ce suppresseur de tumeurs est en effet muté dans nombreux cas de carcinomes pulmonaires. Malheureusement, malgré les recherches effectuées sur 15 carcinomes pulmonaires de 4 types différents (**Tableau IV-3**), il n'a pas été possible de détecter la présence de mutations, que ce soit par DHPLC ou par séquençage.

Types de carcinomes pulmonaires	Nombre
Carcinoadénome squameux	3
Adénocarcinome	3
Carcinome épidermoïde	8
Carcinome anaplasique	1
Total	15

Tableau IV-3: types de carcinomes pulmonaires utilisés pour la recherche de mutations dans *P53* et *hyal-2*.

Le problème de validation de la méthode de détection restait donc entier et ne fut résolu que lors de l'identification du polymorphisme n°2 dans l'exon 2 d'*hyal-2* chez des sujets sains (cf. paragraphe IV.D.2). Ce polymorphisme, avec une fréquence de plus de 40%, devait être en toute logique détecté parmi les 15 échantillons de tumeurs. De fait, l'expérience s'est révélée concluante et le polymorphisme a pu être mis en évidence sur 7 des 15 tumeurs testées, soit 47% (**Figure IV-28**).

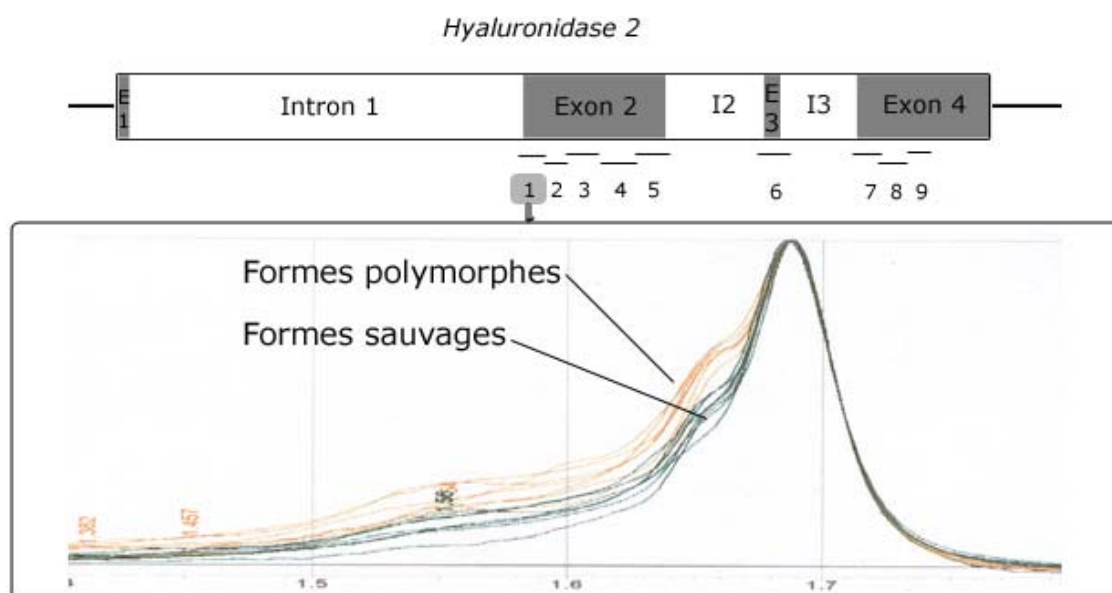


Figure IV-28 : Analyse DHPLC de la région génique d'*hyal-2* présentant un polymorphisme fréquent ; l'analyse est faite sur de l'ADN extrait de 15 carcinomes pulmonaires différents.

Il reste maintenant à analyser les neuf couples de primers définis pour couvrir la détection de mutations dans les régions codantes d'*hyal-2*. Je ne ferai pas ici un commentaire particulier pour chaque fragment étudié mais une analyse globale des résultats. En effet, il n'a pas été possible de mettre en évidence des mutations lors de cette recherche, bien que, parmi les profils obtenus, certains laissaient soupçonner la présence d'une variation dans l'ADN (**Figure IV-29**). Afin de ne laisser planer aucun doute, un séquençage a été effectué pour chaque échantillon présentant un profil suspect. Ces différents séquençages n'ont jamais confirmé la présence de variations génétiques comme le laissaient penser les résultats obtenus par l'analyse par DHPLC.

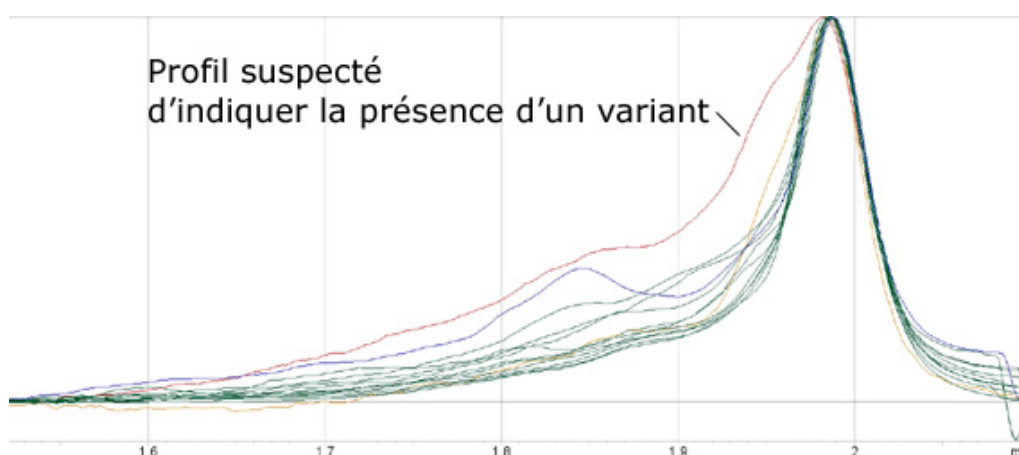


Figure IV-29: Exemple de profil suspecté d'indiquer la présence d'un variant et ayant fait l'objet d'un séquençage. Le chromatogramme montré ici correspond à l'analyse de l'ADN amplifié par les primers n°1.

Ces profils « suspects » n'étant pas dus à la présence d'une variation génétique, il était légitime de s'interroger sur leur origine. Le problème majeur réside probablement dans le mode de conservation des tissus dont est extrait l'ADN. Si le formol est un bon fixateur et la paraffine, un bon milieu de conservation, il ne faut pas oublier que l'ADN y est fortement fragmenté. A ceci vient s'ajouter le fait qu'il est difficile d'obtenir une pureté optimale lorsqu'on extrait cet ADN à partir de coupes en paraffine. Or, l'efficacité de la PCR est influencée par le niveau de fragmentation de l'ADN et la réaction peut être inhibée par la présence d'éventuels contaminants présents dans le produit d'extraction. Il en résulte des produits PCR de qualité et d'intensité variables qui par conséquent influent fortement sur la qualité des pics obtenus par la chromatographie.

V. DISCUSSION ET PERSPECTIVES

A. Choix de la DHPLC comme méthode de détection de polymorphismes

La DHPLC n'est pas la seule méthode existante pour rechercher des polymorphismes dans un gène. Parmi les autres méthodes, on peut citer les techniques de Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Temperature Gradient Gel Electrophoresis (TGGE), Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) ou encore l'Enzymatic Mutation Detection (EMD). En comparaison avec la DHPLC, ces méthodes présentent plusieurs inconvénients. Par exemple, toutes les méthodes citées requièrent une étape d'électrophorèse, ce qui rend l'analyse d'un grand nombre d'échantillons extrêmement longue. Un autre problème est l'utilisation d'éléments toxiques comme la formamide pour la DGGE et TGGE et de sondes radioactives dans le cas de la SSCP.

En plus de ces inconvénients inhérents à la technique, soulignons celui du taux de détection de mutations. En effet, aucune des méthodes alternatives ne peut atteindre le taux de 98% obtenu avec la DHPLC. Tout au plus, peut-on espérer atteindre un taux de détection de mutations de 85% avec les autres méthodes.

Bien que la DHPLC soit idéale de par sa rapidité et son faible coût à l'injection pour l'analyse de grandes séries d'échantillons, il faut toutefois reconnaître certaines limitations. La première est la limitation de taille des fragments d'ADN analysables. Il faut en effet se limiter à une taille maximale d'environ 700 paires de bases. Ceci augmente dès lors considérablement le nombre de fragments à générer lors de l'étude de gènes de grande taille. L'exemple le plus frappant est sans doute celui des gènes *BRCA1* et *BRCA2* (Breast Cancer) pour lesquels on recherche des mutations dans la prévention et le diagnostic de certains cancers mammaires. Ces deux gènes nécessitent respectivement 34 et 26 PCR pour permettre une analyse complète de leurs régions codantes.

Un autre inconvénient peut également survenir dans certains cas. Lorsqu'une mutation est située dans une région de l'ADN riche en GC, cela nécessite de chauffer très fort le fragment afin de rendre celui-ci instable. Par moment, la température à atteindre peut être tellement élevée qu'elle dénature complètement le fragment d'ADN ce qui réduit alors à néant toute chance de mettre en évidence la mutation.

B. Inconvénients liés au matériel biologique employé

Plusieurs points sont à relever ici. Premièrement, l'utilisation de tissus fixés dans la paraffine. Comme nous l'avons vu, plusieurs difficultés liées à l'utilisation de tels tissus rendent les analyses par DHPLC moins facilement interprétables. En effet, de nombreux profils suspectés d'être le fait d'une variation dans l'ADN se sont révélés être des faux positifs lors du séquençage. Pour pallier à ce problème, il aurait été intéressant de pouvoir étudier l'ADN de tumeurs issues de biopsies fraîches. Cependant, hormis dans le cas d'une étude clinique en milieu hospitalier, ceci était difficilement réalisable à l'IPG puisque les biopsies reçues sont dévolues à la réalisation de coupes histologiques.

Le deuxième problème qui se pose concerne celui des analyses effectuées au niveau du sérum des patients. En effet, le sang de chaque patient séjourne un temps variable à température ambiante. Les prises de sang étant effectuées à des heures différentes dans des régions différentes de la Belgique, il peut se passer une journée entière avant que le sérum ne puisse être extrait et congelé. Tout ceci fait que certains éléments présents dans le sérum peuvent avoir subi une dégradation plus ou moins forte en fonction du temps passé à température ambiante. L'idéal aurait donc été de pouvoir traiter le sang dès la prise de sang afin d'obtenir des sérums conservés dans les mêmes conditions. Mais, tout comme dans le cas des échantillons de tumeurs, cela n'était techniquement pas réalisable dans le cadre de l'IPG.

C. Perspectives

Les perspectives les plus envisageables se situent au niveau de l'étude des tumeurs. En effet, beaucoup d'interrogations subsistent quant aux rôles que pourraient jouer les hyaluronidases dans le développement de nombreuses tumeurs. En conséquence, la recherche de mutations au niveau des gènes d'hyaluronidases dans ces tumeurs serait susceptible d'apporter bon nombre d'informations sur l'implication de celles-ci dans la cancérisation.

Outre l'étude des gènes d'hyaluronidases proprement dit, il serait également envisageable d'étudier les promoteurs de ces mêmes gènes dans un futur proche. Les promoteurs étant le lieu de nombreuses régulations de l'expression des gènes, il serait intéressant d'y rechercher si des mutations ne peuvent être à l'origine de la perte ou de la surexpression d'hyaluronidases dans certains cas de tumeurs. Malheureusement, on ne connaît à l'heure actuelle que les promoteurs des hyaluronidases de certains rongeurs. On peut tout au plus obtenir aujourd'hui une estimation de la position des promoteurs par alignement des séquences des promoteurs connus chez les rongeurs avec l'ADN humain.

VI. REFERENCES

- Botstein, D., & Risch, N. Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian diseases, future approaches for complex disease. *Nat Genet* **33**, Suppl: 228-37 (2003).
- Cedazo-Minguez, A., & Cowburn, R.F. Apolipoprotein E: a major piece in the Alzheimer's disease puzzle. *J Cell Mol Med* **5**, 254-66 (2001).
- Cherr, G., Yudin, A.I., & Overstreet, J.W. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. *Matrix Biol* **20**, 515-25 (2001).
- Csoka, A. B., Scherer, S. W. & Stern, R. Expression analysis of six paralogous human hyaluronidase genes clustered on chromosomes 3p21 and 7q31. *Genomics* **60**, 356-61 (1999).
- Csoka, A. B., Frost, G. I. & Stern, R. The six hyaluronidase-like genes in the human and mouse genomes. *Matrix Biol* **20**, 499-508 (2001).
- Danilkovitch-Miagkova, A., Duh, F. M., Kuzmin, I., Angeloni, D., Liu, S. L., Miller, A. D. & Lerman, M. I. Hyaluronidase 2 negatively regulates RON receptor tyrosine kinase and mediates transformation of epithelial cells by jaagsiekte sheep retrovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4580-5 (2003).
- De Las Heras, M., Barsky, S. H., Hasleton, P., Wagner, M., Larson, E., Egan, J., Ortin, A., Gimenez-Mas, J. A., Palmarini, M. & Sharp, J. M. Evidence for a protein related immunologically to the Jaagsiekte sheep retrovirus in some human lung tumors. *Eur. Respir. J.* **16**, 330-332 (2000).
- Duran-Reynals, F. Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains de certains organes. *CR Séances Soc. Biol. Fil.* **99**, 6-7 (1928).
- Evanko, S., & Wight, T. Intracellular hyaluronan. In website: www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html (2001)
- Frost, G. I., Mohapatra, G., Wong, T. M., Csoka, A. B., Gray, J. W. & Stern, R. HYAL1 LUCA-1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p21.3, is inactivated in head and neck squamous cell carcinomas by aberrant splicing of pre-mRNA. *Oncogene* **19**, 870-7 (2000).
- Gatphayak, K. Molecular characterization of the porcine hyaluronidase gene cluster on SSC13q21 (2003).
- Heldin, P., Laurent, T. C. & Heldin, C. H. Effect of growth factors on hyaluronan synthesis in cultured human fibroblasts. *Biochem J* **258**, 919-22 (1989).
- Heldin, P. Importance of hyaluronan biosynthesis and degradation in cell differentiation and tumor formation. *Braz J Med Biol Res* **36**, 967-73 (2003).

- Laurent, T.C. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives. Portland Press Ltd, London, UK (1998).
- Lepperdinger, G., Strobl, B. & Kreil, G. HYAL2, a human gene expressed in many cells, encodes a lysosomal hyaluronidase with a novel type of specificity. *J Biol Chem* **273**, 22466-70 (1998).
- Lepperdinger, G., Mullegger, J. & Kreil, G. Hyal2--less active, but more versatile? *Matrix Biol* **20**, 509-14 (2001).
- Lerman, M. I. & Minna, J. D. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. The International Lung Cancer Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Res* **60**, 6116-33 (2000).
- Lin, G. & Stern, R. Plasma hyaluronidase (Hyal-1) promotes tumor cell cycling. *Cancer Lett* **163**, 95-101 (2001).
- Liu, D., Pearlman, E., Diaconu, E., Guo, K., Mori, H., Haqqi, T., Markowitz, S., Willson, J. & Sy, M. S. Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7832-7 (1996).
- Lokeshwar, V. B., Schroeder, G. L., Carey, R. I., Soloway, M. S. & Iida, N. Regulation of hyaluronidase activity by alternative mRNA splicing. *J Biol Chem* **277**, 33654-63 (2002).
- Novak, U., Stylli, S. S., Kaye, A. H. & Lepperdinger, G. Hyaluronidase-2 overexpression accelerates intracerebral but not subcutaneous tumor formation of murine astrocytoma cells. *Cancer Res* **59**, 6246-50 (1999).
- Patel, S., Turner, P.R., Stubberfield, C., Barry, E., Rohlff, C.R., Stamps, A., McKenzie, E., Young, K., Tyson, K., Terrett, J., Box, G., Eccles, S., & Page, M.J. Hyaluronidase gene profiling and role of hyal-1 overexpression in an orthotopic model of prostate cancer. *Int J Cancer* **97**, 416-24 (2002).
- Ponta, H., Sherman, L., & Herrlich, P.A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 33-45 (2003).
- Rai, S. K., Duh, F. M., Vigdorovich, V., Danilkovitch-Miagkova, A., Lerman, M. I. & Miller, A. D. Candidate tumor suppressor HYAL2 is a glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored cell-surface receptor for jaagsiekte sheep retrovirus, the envelope protein of which mediates oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4443-8 (2001).
- Salustri, A., & Fulop, C. Role of hyaluronan during ovulation and fertilization. In website: www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html (1999).
- Schork, N. J., Fallin, D. & Lanchbury, J. S. Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clin Genet* **58**, 250-64 (2000).

- Shuster, S., Frost, G. I., Csoka, A. B., Formby, B. & Stern, R. Hyaluronidase reduces human breast cancer xenografts in SCID mice. *Int J Cancer* **102**, 192-7 (2002).
- Stern, R. Minireview on the mammalian hyaluronidases. In website: www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/hyaluronanE.html (2001).
- Stern, R., Shuster, S., Wiley, T. S. & Formby, B. Hyaluronidase can modulate expression of CD44. *Exp Cell Res* **266**, 167-76 (2001).
- Stern, R. Devising a pathway for hyaluronan catabolism: are we there yet? *Glycobiology* **13**, 105R-115R (2003).
- Sugahara, K. N., Murai, T., Nishinakamura, H., Kawashima, H., Saya, H. & Miyasaka, M. Hyaluronan oligosaccharides induce CD44 cleavage and promote cell migration in CD44-expressing tumor cells. *J Biol Chem* **278**, 32259-65 (2003).
- Toole, B. P. Hyaluronan in morphogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **12**, 79-87 (2001).
- Triggs-Raine, B., Salo, T. J., Zhang, H., Wicklow, B. A. & Natowicz, M. R. Mutations in HYAL1, a member of a tandemly distributed multigene family encoding disparate hyaluronidase activities, cause a newly described lysosomal disorder, mucopolysaccharidosis IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6296-300 (1999).
- Tuhkanen, H., Anttila, M., Kosma, V. M., Yla-Herttuala, S., Heinonen, S., Kuronen, A., Juhola, M., Tammi, R., Tammi, M. & Mannermaa, A. Genetic alterations in the peritumoral stromal cells of malignant and borderline epithelial ovarian tumors as indicated by allelic imbalance on chromosome 3p. *Int J Cancer* **109**, 247-52 (2004).